



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Aufbau und Evaluierung eines Messsystems zur
orts aufgelösten Erfassung elektrischer Aktivitätsmuster von
in-vitro kultivierten Nervenzellen durch mikrostrukturierte
extrazelluläre Elektroden-Arrays auf einem Biochip

Verfasser

Lukas Schneider

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 411

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Physik

Betreuerin / Betreuer:

O. Univ. Prof. Dr. Emmerich Bertagnolli

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	4
1 Einleitung	5
2 Theorie	8
2.1 Neuronale Aktivität	8
2.1.1 Entstehung neuronaler Signale	8
2.1.2 Neuronale Signalausbreitung	13
2.2 Ableitung neuronaler Aktivität	18
2.2.1 Zelladhäsion von Neuronen in vitro	18
2.2.2 Phasengrenze Elektrode-Elektrolyt	19
2.2.3 Methoden der Ableitung	20
2.2.4 Einsatzbereich eines Mikroelektrodenarrays	21
2.3 Mikroelektronische Beschichtungsverfahren	22
2.3.1 Lithographische Strukturierung	22
2.3.2 Plasmaunterstützte Beschichtungsverfahren	23
3 Messmethode	25
3.1 Zellkultivierung von Neuronen	26
3.2 Biochip-Prozessierung	29
3.2.1 MEA-Dimensionierung	29
3.2.2 Schematischer Prozessablauf	32
3.2.3 Haftung der Materialien	34
3.2.4 Fertigung der Zellkulturkammern	34
3.2.5 Geräte und Parameter im Prozessablauf	35
3.3 Kontaktierung der Biochips	43
3.3.1 Kontaktkonzept	43
3.3.2 Kontakthalterung	44
3.4 Signalverstärkung	45
3.4.1 Verstärkerspezifikationen	45
3.4.2 Mehrkanalkonzept	47
3.4.3 Hochpassfilterkonzept	49
3.5 Der Messaufbau	51
3.5.1 Modulkonzept	51
3.5.2 Signalgenerierung	52
3.5.3 Datenerfassung	53

4 Ergebnisse	55
4.1 MEA-Prozessierung	57
4.1.1 Materialkonzept	57
4.1.2 Probleme im Prozessablauf	62
4.1.3 Optimierung des Prozessablaufs	65
4.1.4 Herstellung der Mikroelektrodenarrays	67
4.2 Biochip-Prozessierung	69
4.2.1 Oberflächenvergütung	69
4.2.2 funktionalisierter Zellkulturkammerboden	72
4.2.3 Zellkulturkammern	76
4.3 Kalibrierung des Messsystems	77
4.3.1 Funktionstests Grundsaltung	77
4.3.2 Signalgenerierung unter Belastung	80
4.3.3 Zeitliche Auflösung der Datenerfassung	81
4.3.4 Mehrkanalverstärkerschaltung	83
4.3.5 SNR im Verstärkungsfaktorvergleich	86
4.3.6 SNR bei stufenweiser Verstärkerschaltung	88
4.4 Elektrodenbelegung	90
4.4.1 Auf Masse legen der Zellkulturkammer	90
4.4.2 Dreipunktmessung	91
4.4.3 Vierpunktmessung	94
4.5 Rauschreduktion	95
4.5.1 Stromquellenvergleich	95
4.5.2 Funkübertragung und Schirmung	96
4.5.3 Tiefpassfiltervergleich	98
4.5.4 Hochpassfiltervergleich	98
4.5.5 Softwarebasierte Signalkonditionierung	101
4.6 Referenzmessungen	103
4.6.1 Signalantwort vs. Abstand der Elektroden	103
4.6.2 Signalantwort vs. Elektrodendurchmesser	106
4.6.3 Messung an lebenden Neuronen	108
5 Resümee	112
Quellenverzeichnis	115
Danksagung	120
Lebenslauf	121

Kurzfassung

In der Neurologie hat sich die Analyse der Reizreaktionen von Nervenzellen bewährt, um die an der neuronalen Reizverarbeitung beteiligten Mechanismen zu ergründen. So können beispielsweise Nervenerkrankungen und die Einflüsse entsprechender Medikamente spezifisch untersucht werden. Dabei kommen je nach Aufgabenstellung verschiedenste Methoden der Reizung und Aufzeichnung der neuronalen Reizreaktionen zum Einsatz. Da die neuronale Reizverarbeitung mit Spannungsänderungen an der Zellmembran einhergeht, findet die Ableitung der neuronalen Aktivität mit Hilfe von Elektroden an der Zellmembran ein breites Anwendungsgebiet.

In dieser Arbeit wurde ein komplettes elektrisches Messsystem mit einem Array extrazellulärer Elektroden zur orts aufgelösten Aufzeichnung neuronaler Signale von Zellkulturen in vitro entwickelt und systematisch untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt war dabei die Herstellung und Evaluierung eines problemorientierten, biokompatiblen Mikroelektrodenarrays mit integrierter Zellkulturkammer mit Hilfe halbleitertechnologischer Verfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Prozessablauf zur Produktion eines Biochips mit 10 µm durchmessenden Goldelektroden entwickelt, der eine Elektrodenvergütung mit Titanitrid zur Verbesserung der Zelladhäsion, die Strukturierung des Zellkulturkammerbodens zum geordneten Wachstum der Zellkulturen sowie die Herstellung und Anhaftung der Zellkulturkammer erlaubt. Dabei wurde die Biokompatibilität aller eingesetzten Materialien bestätigt.

Ein weiterer Schwerpunkt war der Aufbau und die Evaluierung des elektronischen Messsystems. Es wurde ein Messaufbau entwickelt, der es erlaubt, die einzelnen Elektroden auf dem Biochip elektrisch zu kontaktieren und Spannungsunterschiede kleiner 100 µV vom Biochip abzuleiten und tausendfach verstärkt vom Rauschen unterscheidbar digital aufzuzeichnen. Im Folgenden wurde dieser Messaufbau eingesetzt, um den hergestellten Biochip elektrisch zu charakterisieren. Ein abschließender Versuch an auf dem Biochip ausgesäten lebenden Zellen konnte die Funktion des Gesamtsystems bestätigen. Es wurden wesentliche Zusammenhänge aufgezeigt und grundlegende Erkenntnisse für die Herstellung eines problemorientierten Messsystems gewonnen. So bietet diese Arbeit das Potential für zukünftige Entwicklungen.

1 Einleitung

Hintergrund

Die Reizweiterleitung in Nervenzellen spielt eine wesentliche Rolle in einer Vielzahl von biologischen Prozessen. Die Funktionsweise des Schmerzempfindens oder auch das Gedächtnis sowie eine breite Palette von neurologischen Erkrankungen können durch Ableitungen neuronaler Aktivität entsprechender Nervenzellen genauer beschrieben werden. Die neuronale Reizweiterleitung bedient sich elektrischer Mechanismen, weswegen sie mit Elektroden abgeleitet werden kann. Dabei entspricht ein neuronaler Aktionsimpuls einem etwa eine Millisekunde andauernden Potentialunterschied an der Zellmembran von rund 70 mV (von innen nach außen), was entsprechende Untersuchungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik gezeigt haben.

Motivation

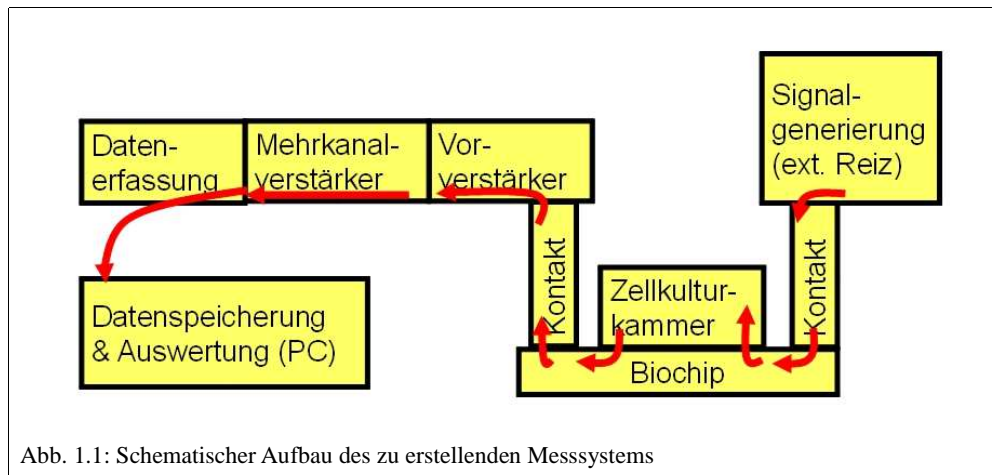
Die Herausforderung besteht nun darin, neuronale Aktivitätsmuster, also den zeitlichen Verlauf der Aktivitäten mehrerer Neuronen in einem Netzwerk, mit einem elektrischen Messsystem aufzuzeichnen und in der Folge auswerten zu können. In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, die neuronalen Aktivitäten eines in vitro kultivierten Neuronennetzwerks mit einem Array extrazellulärer Mikroelektroden abzuleiten, um ein orts aufgelöstes Bild der neuronalen Aktivität zu erhalten. Der Potentialunterschied ist erwartungsgemäß bei extrazellulärer Ableitung wesentlich geringer als bei intrazellulärer Ableitung. Dieser Nachteil der extrazellulären Messung ist jedoch nebensächlich, solange neuronale Signale identifizierbar detektiert werden können, da die Messung der Aktivität an sich, nicht aber die exakte Beschreibung der Form eines Aktionsimpulses im Vordergrund steht.

Vielmehr ist die Zielsetzung dieser Arbeit, ein zeitlich wie örtlich aufgelöstes Bild der Aktivitätsmuster aufzunehmen, um so die Funktionalität eines Neuronennetzwerks anschaulich darzustellen zu können. Der Informationsgehalt dieser Aktivitätsmuster geht deutlich über den eines einzelnen aufgezeichneten Aktionsimpulses hinaus. Der zu entwickelnde Messaufbau soll in zukünftigen Messungen auch erlauben, während biologischer Eingriffe Aktivitätsmuster elektrisch abzuleiten, um Erkenntnisse über die Auswirkungen ausgewählter pharmazeutischer Substanzen auf die Funktionalität des Nervensystems gewinnen zu können. Damit die Ergebnisse vergleichbar bleiben, sollte die Messung reproduzierbar sein, weswegen der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Ableitung neuronaler Aktivitätsmuster in Zellkulturen in vitro liegt.

Zielsetzung

Als Ziel dieser Arbeit soll ein modulares Messsystem (siehe Kap. 3.5.1) zur Aufzeichnung von Aktivitätsmustern neuronaler Zellkulturen mit Hilfe von Arrays aus Mikroelektroden (MEA) auf einem Biochip (MEA mit Zellkulturkammer) mit passender Verstärkerschaltung aufgebaut werden (siehe Abb. 1.1). Damit soll eine eingehende Analyse der Eignung der Komponenten im gesamten Messsystem durchgeführt werden. Dazu soll zunächst ein geeignetes MEA dimensioniert (siehe Kap. 3.2.1) und mit Hilfe lithographischer Strukturierung aus biokompatiblen Materialien (siehe Kap. 4.2.1) in mehreren Prozessschritten (siehe Kap. 3.2.2) hergestellt werden. Außerdem soll ein Verfahren zur Fertigung einer Zellkulturkammer entwickelt werden, um für die Ableitung neuronaler Aktivität lebende Zellen in vitro direkt auf dem MEA kultivieren zu können. Dabei soll unter anderem die Möglichkeit gegeben sein, Signale vom Biochip in mehreren Kanälen (siehe Kap. 3.4.2) mit einem Vorverstärker direkt zu

verstärken (siehe Kap. 3.3.1) oder aber die Signale bevor sie verstärkt werden zu filtern (siehe Kap. 3.4.3). Anschließend sollen Vergleiche einzelner Komponenten des Messsystems durchgeführt werden, um dieses zu charakterisieren und in weiteren Arbeiten gezielt optimieren zu können. Der zeitliche Ablauf der mit diesem Aufbau durchführbaren Messung ist zur besseren Übersicht in Abb. 1.2 schematisch dargestellt.



Der theoretische Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Beschaffenheit und Messbarkeit neuronaler Aktivitätsmuster sowie mit den Beschichtungsverfahren, die zur Prozessierung der Biochips eingesetzt werden sollen. Im methodischen Teil sollen die Zellkultivierung von Neuronen, die Biochip-Prozessierung sowie der Aufbau des Messsystems mit Kontaktierung und Verstärkerschaltung näher beschrieben werden. Im Ergebnisteil sollen die Ergebnisse der Biochip-Prozessierung sowie die Methoden zur Kalibrierung und Eigenheiten des Messsystems präsentiert und durch geeignete Referenzmessungen die zentralen Fragestellungen untersucht werden. Die gesamte Arbeit orientiert sich an der Beantwortung folgender Forschungsfragen:

- Kann ein geeigneter Biochip zum Ableiten neuronaler Aktivität mit Methoden der Halbleitertechnologie hergestellt werden?

Im Zuge eines Materialkonzepts soll geklärt werden, ob biokompatible Materialien zur Prozessierung des Biochips gefunden werden können (siehe Kap. 4.1). Außerdem soll ein Verfahren zur Fertigung einer Zellkulturkammer und deren Haftung auf dem Biochip sowie Methoden zur weiteren problemspezifischen Anpassung des Biochips erarbeitet werden (siehe Kap. 4.2).

- Kann ein geeignetes Messsystem entwickelt werden, um neuronale Aktivitäten von diesem Biochip abzuleiten?

Bei dieser Aufgabenstellung soll geklärt werden, welchen Anforderungen dabei die Verstärkerschaltung genügen muss (siehe Kap. 4.3). Es soll untersucht werden, ob es notwendig ist, die abgeleiteten Signale direkt zu verstärken, ob ein simultanes Verstärken mehrerer Kanäle möglich ist und welcher Verstärkungsfaktor am besten geeignet ist. Außerdem ist zu klären, welche Anforderungen an das Datenerfassungssystem hinsichtlich zeitlicher Auflösung, Empfindlichkeit, und Möglichkeiten zur Nachbearbeitung gestellt werden. Des Weiteren sollen sich anbietende Messweisen (siehe Kap. 4.4) und Methoden zur Rauschreduktion (siehe Kap. 4.5) verglichen werden. Anschließend sollen Experimente durchgeführt werden, die zeigen, ob bzw. wie Neuronen mit dem Biochip elektrisch stimuliert werden können (siehe Kap. 4.6).

In einem abschließenden Resümee sollen die Ergebnisse mit Bezug auf die gestellten Forschungsfragen in einem Überblick zusammengefasst sowie Optimierungsoptionen für weitere Arbeiten zu diesem Thema gesammelt werden.

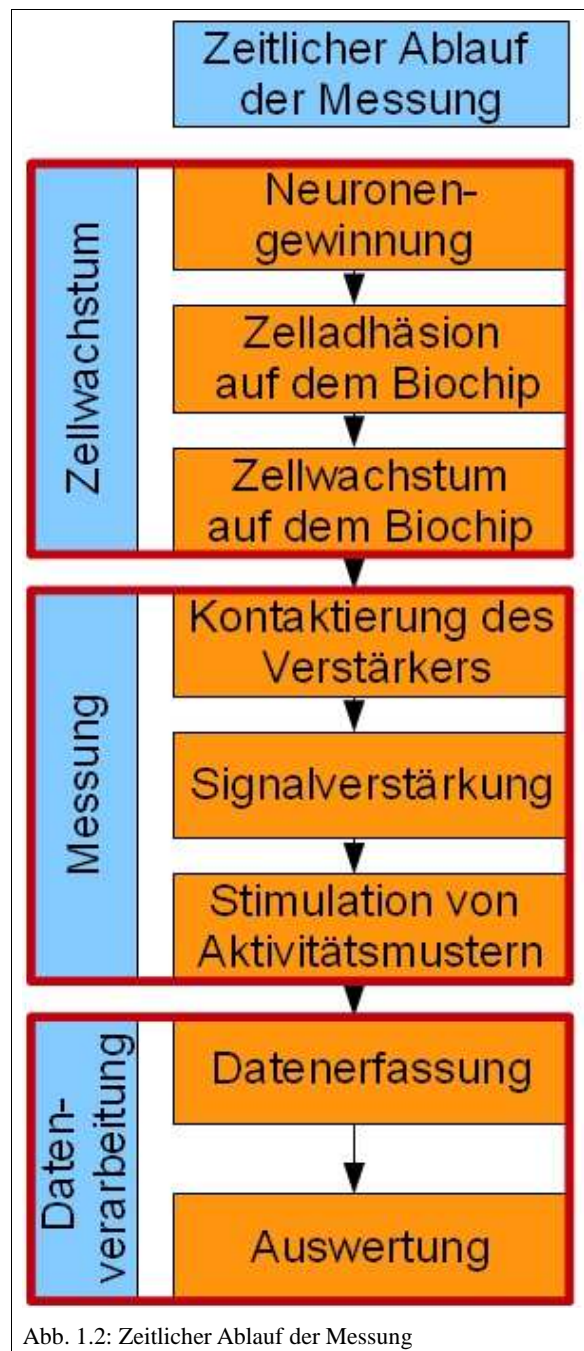


Abb. 1.2: Zeitlicher Ablauf der Messung

2 Theorie

Um einen Messaufbau für neuronale Aktivitätsmuster zu konstruieren, sollte zunächst der Ablauf der Messung schematisch dargestellt werden, damit die einzelnen Schritte theoretisch fundiert werden können

(siehe Abb. 1.2). Des Weiteren soll auf die Bedeutung neuronaler Aktivitätsmuster (siehe Kap. 2.1), auf die Ableitung neuronaler Aktivität (siehe Kap. 2.2) sowie auf Beschichtungsverfahren für ein geeignetes Messsystem (siehe Kap. 2.3) eingegangen werden.

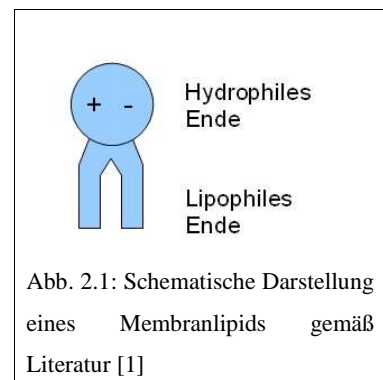
2.1 Neuronale Aktivität

Für die Ableitung neuronaler Aktivität sollten die Eigenschaften eines solchen Signals bekannt sein. Dazu ist es zunächst notwendig, die Mechanismen für die Entstehung neuronaler Aktivität zu beleuchten. Dabei wird zwischen chemischer und elektrischer neuronaler Aktivität unterschieden. Im folgenden wird zunächst die Entstehung der elektrischen Aktivität beleuchtet (siehe Kap. 2.1.1). Da die chemische Aktivität der Neuronen besonders bei der Weiterleitung eines elektrischen Signals von einem Neuron zum nächsten auftritt, wird sie im Zuge der Beschreibung der Signalausbreitung (siehe Kap. 2.1.2) eingehender erläutert.

2.1.1 Entstehung neuronaler Signale

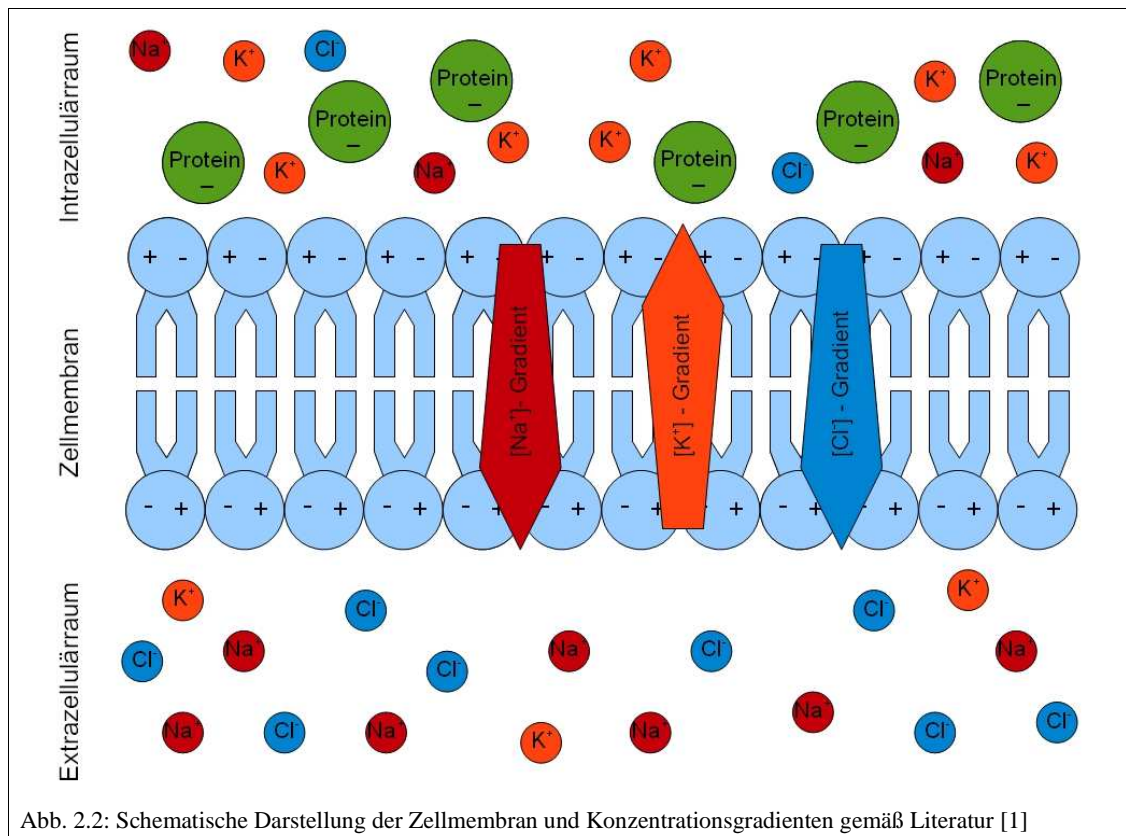
Für die elektrischen Eigenschaften eines **Neurons** (Nervenzelle) und speziell für die Entstehung neuronaler Aktivitätsmuster ist seine **Zellmembran** (Zellwand) von herausragender Bedeutung.

Das Grundgerüst der Zellmembran stellt eine doppelte Hülle aus Lipiden – eine **Doppellipidschicht** – dar, die den **Intrazellulärraum** (Zellinnenraum) vom **Extrazellulärraum** (Zellaußenraum = umgebendes Medium) trennt (siehe Abb. 2.1 und 2.2). Die Zellmembran kann so die Ionen im Zellinneren von den Ionen außerhalb der Zelle trennen. Diese Ionen sind als Ladungsträger auch die Grundlage jeder chemischen Aktivität der Zelle.



Die Konzentrationen der intrazellulär und extrazellulär gelösten Ladungsträger sind dabei sehr unterschiedlich (siehe Tab. 2.1), was einem Konzentrationsgradienten (räumlicher Konzentrationsanstieg) normal zur Zellmembran entspricht. Die Doppellipidschicht wirkt dabei in ihrem elektrischen Verhalten wie ein Kondensator, Ladungsträger stauen sich hier innen wie außen an, die dadurch entstehende Spannung an der Zellmembran wird **Membranspannung** (Potentialunterschied zwischen Intra- und Extrazellulärraum) genannt. Große Bedeutung kommt nun den in der Zellmembran eingelagerten spezifisch wirkenden Transportproteinen zu, die Ladungsträger durch die Zellmembran befördern können.

Im weiteren werden vier für diese Arbeit relevante Typen von Transportproteinen unterschieden: Passive Ionenkanäle, Ionenpumpen, spannungsgesteuerte Ionenkanäle und rezeptorgesteuerte Ionenkanäle



Ladungsträger	Extrazellulär	Intrazellulär
Na ⁺	120 mmol/l	15 mmol/l
K ⁺	2,5 mmol/l	150 mmol/l
Cl ⁻	12 mmol/l	9 mmol/l
Ca ⁺	1 mmol/l	0 mmol/l

Tab. 2.1: Ladungsträger und Konzentrationen [1]

Passive Ionenkanäle

Passive Ionenkanäle erlauben die Diffusion von Ionen, das heißt die thermische Eigenbewegung, die zum Ausgleich des Konzentrationsgradienten führt, durch die Zellmembran in beide Richtungen. Dabei gibt es für jede Ionensorte einen anderen Kanaltyp (siehe Abb. 2.3). Den passiven Ionenkanälen entsprechen hinsichtlich ihres elektrischen Verhaltens somit ionenspezifische Widerstände parallel zur Kapazität der Zellmembran.

So können sich die Konzentrationsgradienten ausgleichen, allerdings verschieben sich dabei Ladungen, wodurch eine Änderung der Membranspannung entsteht. Diese wirkt dem Konzentrationsausgleich entgegen. Im Gleichgewicht bezüglich des Transports einer einzigen Ionensorte entspricht die Membranspannung der **Nernst-Spannung** U_N (siehe Tab. 2.2).

Allgemein		Für Chlorionen	
$\nu_A X_A^{-z_A} + \nu_B X_B \rightleftharpoons \nu_A X_A + \nu_B X_B^{-z_B}$	\Rightarrow	$Na_{intrazellulär}^+ \rightleftharpoons Na_{extrazellulär}^+$	Gl. 1
X_i = An der Reaktion beteiligter Stoff, ν_i = Stöchiometrischer Koeffizient z_i = Betrag der Ladung (in Elementarladungen)			
$U_N = \frac{RT}{zF} \ln \prod (\gamma_i [X_i])^{\nu_i}$	\Rightarrow	$U_N = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Na_{intrazellulär}^+]}{[Na_{extrazellulär}^+]}$	Gl. 2
R = Molare Gaskonstante, F = Faraday-Konstante, T = Temperatur, γ_i = Aktivitätskoeffizient, $[X_i]$ = Konzentration von X_i			
$z = \nu_B z_B' = \nu_A z_A' = \text{Äquivalentzahl}$ (Anzahl der pro Formelumsatz übertragenen Elektronen)			

Tab. 2.2: Für die Ionendiffusion durch die Zellmembran relevante Reaktionsgleichung (oben) und Nernst-Spannung (unten)

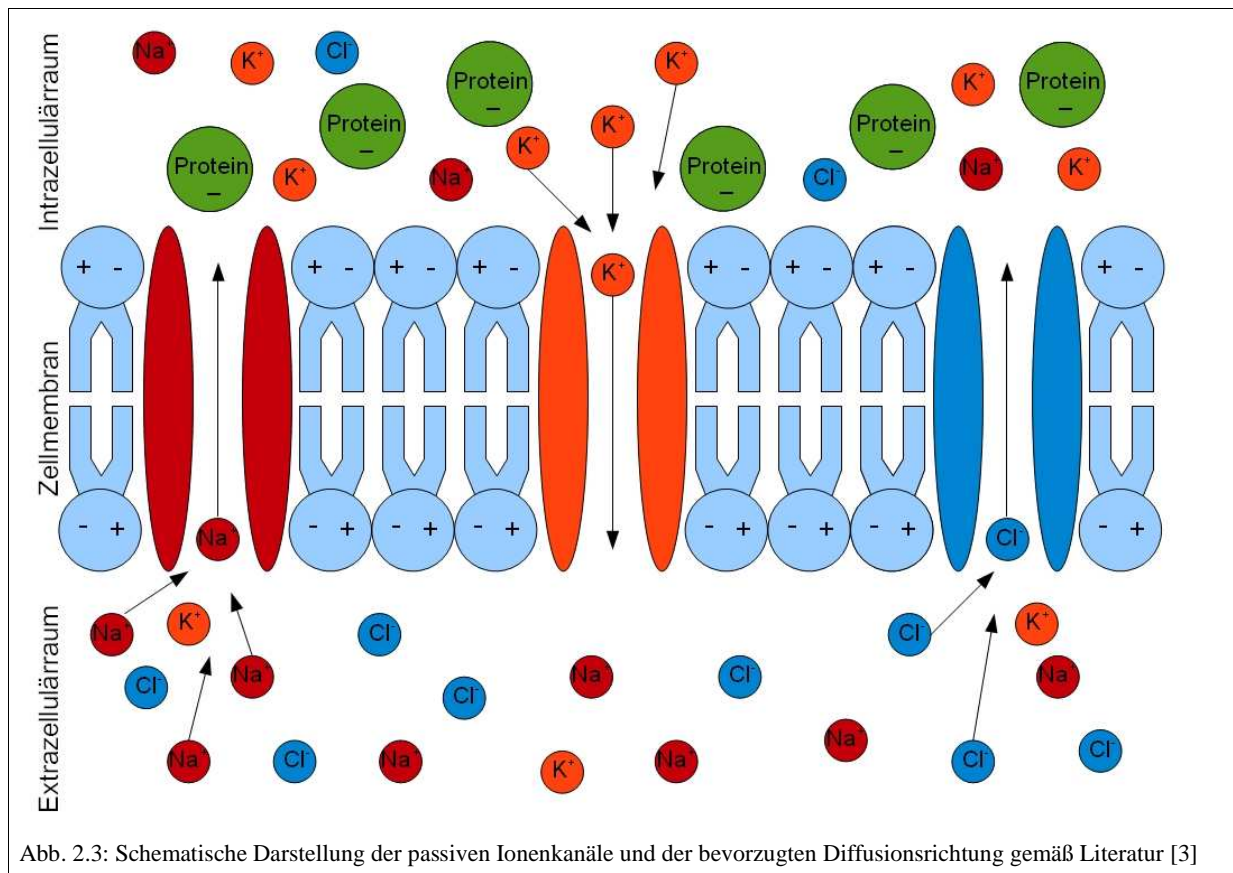


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der passiven Ionenkanäle und der bevorzugten Diffusionsrichtung gemäß Literatur [3]

Chlorionen diffundieren so lange durch die Kanäle, bis die aus der Ionenverschiebung resultierende Spannung den Konzentrationsgradienten ausgleicht. Dies gilt jedoch nur, weil die im Zellinneren angehäuften, meist negativ geladenen Proteine nicht durch die Ionenkanäle passen, also ihren Konzentrationsgradienten nicht ausgleichen können. Die Zellmembran wirkt also als semipermeable Membran [2]. Die aus dem Ausgleich der Konzentrationsgradienten von Natrium- und Kaliumionen resultierenden Spannungen wirken jedoch entgegengesetzt zueinander. Auch wenn die Kalium- gegenüber der Natriumionenbewegung durch die Anzahl und Beschaffenheit der Kanäle begünstigt wird, würden sich die intra- und extrazellulären Konzentrationen und die daraus resultierenden Spannungen mit der Zeit vollkommen ausgleichen, gäbe es nicht aktive Transportkanäle, die Ionenpumpen.

Ionenpumpen

Die Ionenpumpen können unter Spaltung von **ATP** (AdenosinTriPhosphat = organischer Energiespeicher) ihre **Konformation** (räumliche Anordnung) ändern und dadurch in einem Zyklus 3 Natriumionen von innen nach außen und gleichzeitig 2 Kaliumionen von außen nach innen befördern (siehe Abb. 2.4). Den Ionenpumpen entsprechen somit ionenspezifische Strom- bzw. Spannungsquellen.

So bleibt der Natrium-Kalium-Konzentrations-Gradient erhalten. Aus dem Verhältnis der Summen der mit ihrer Permeabilität (P_i) gewichteten Konzentrationen innen wie außen ergibt sich die **Ruhemembranspannung** (Membranspannung im Gleichgewichtszustand) nach der Goldmangleichung (Gl. 3) [4].

$$U_M = \frac{RT}{F} \ln \frac{(P_K [K]_e + P_{Na} [Na]_e + P_{Cl} [Cl]_e)}{(P_K [K]_i + P_{Na} [Na]_i + P_{Cl} [Cl]_i)} \quad \text{Gl. 3}$$

Die Änderung der Membranspannung und das damit einhergehende Öffnen der spannungsgesteuerten Ionenkanäle jedoch erklärt erst die Funktionsweise eines Neurons.

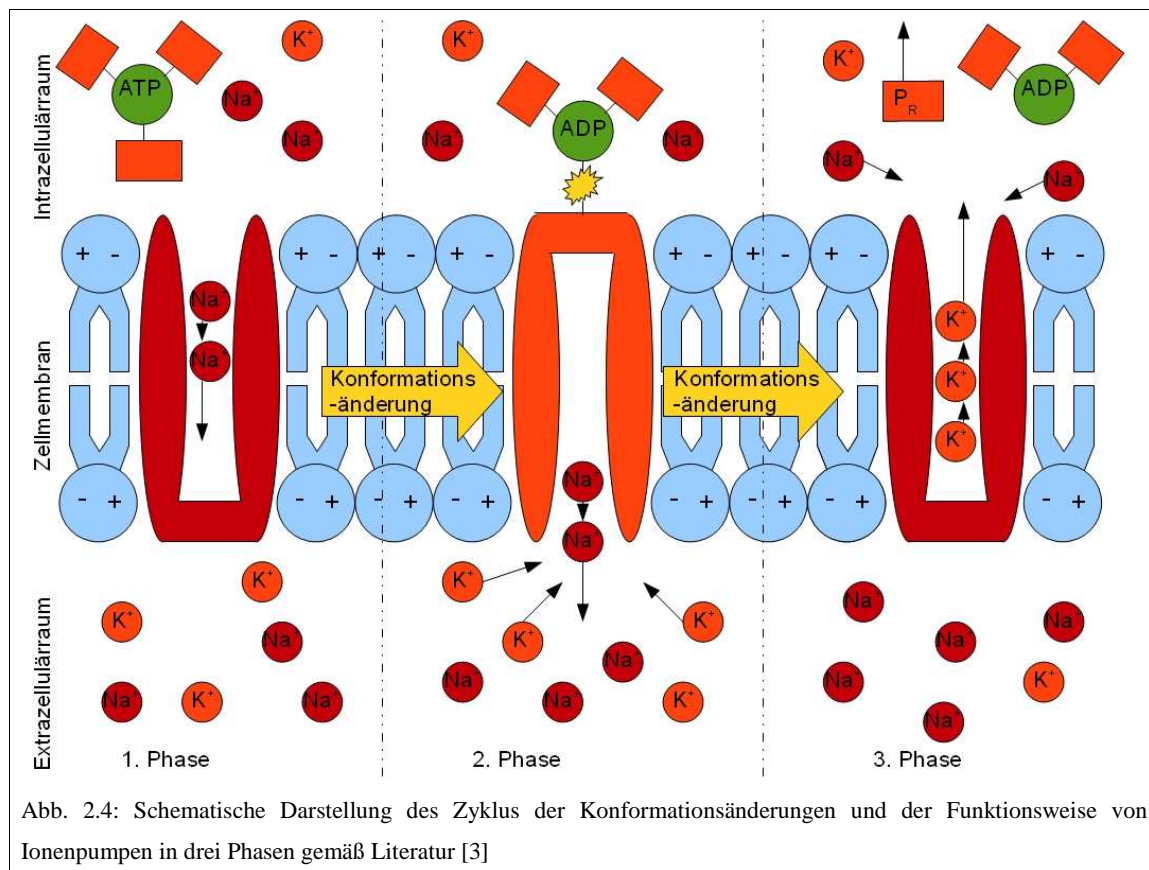


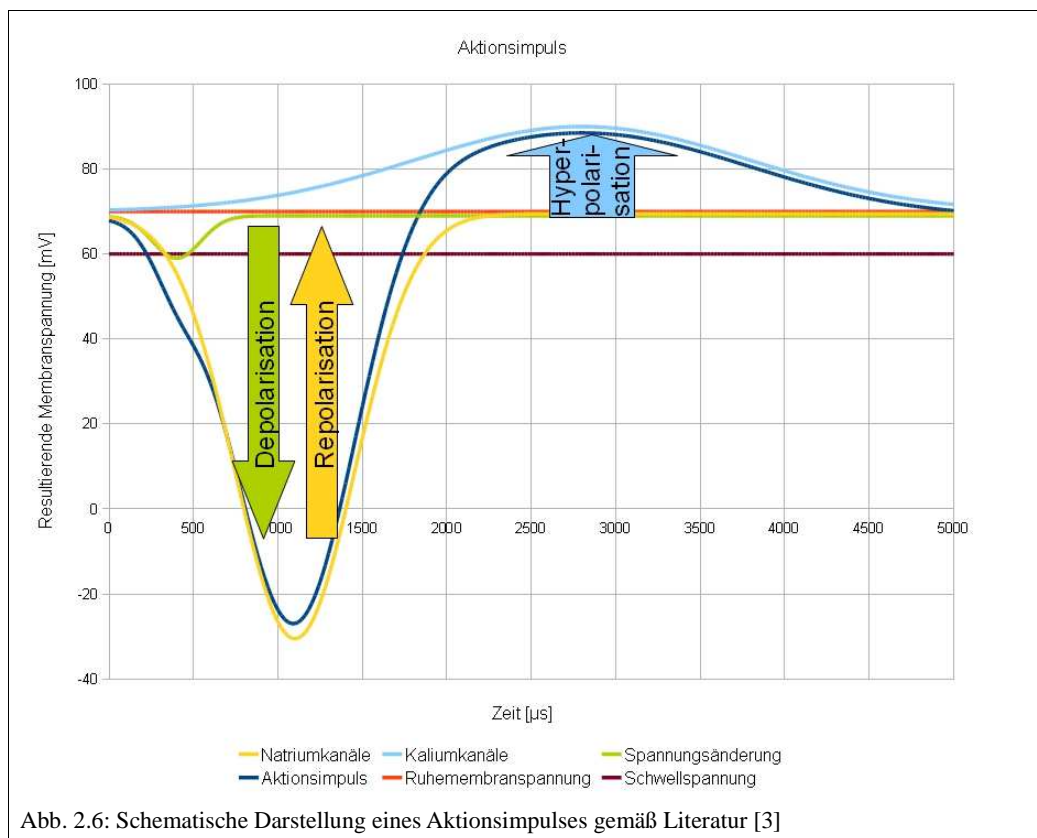
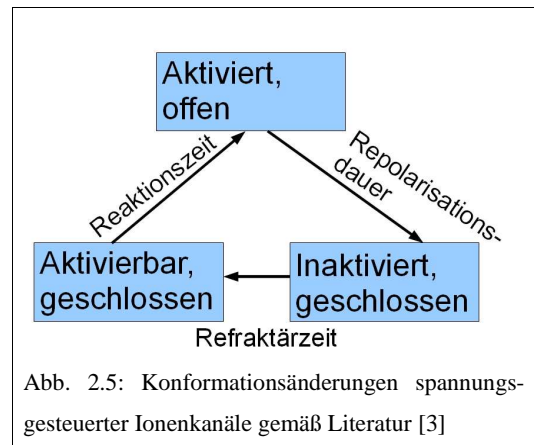
Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Zyklus der Konformationsänderungen und der Funktionsweise von Ionenpumpen in drei Phasen gemäß Literatur [3]

Spannungs-/Rezeptorgesteuerte Ionenkanäle

Die spannungsgesteuerten Ionenkanäle öffnen sich, sobald die Membranspannung eine gewisse **Schwellschpannung** (entspricht der nötigen Aktivierungsenergie zur Konformationsänderung) unterschreitet. Dabei besitzen die spezifischen spannungsgesteuerten Ionenkanäle (für Natrium-, Kalium-, und Calciumionen) andere **Öffnungsdauern** sowie **Reaktionszeiten** (Zeit zwischen dem Erreichen der Schwellschpannung und dem Öffnen der Kanäle, siehe Abb. 2.5).

Die spannungsgesteuerten Natriumkanäle reagieren schneller, werden jedoch auch schneller wieder geschlossen als die Kaliumkanäle. Die Schwellschpannung ist dabei für beide Kanalsorten etwa gleich hoch.

Das erklärt die Entstehung und die typische Form eines **Aktionsimpulses** (gesendetes Signal eines Neurons, siehe Abb. 2.6). Aber auch das Phänomen der **Refraktärzeit** (Zeit zwischen zwei möglichen AIs) ist somit erklärbar. Dabei ist zu beachten, dass neben der **absoluten Refraktärzeit** (Zeit, die eine Konformationsänderung vom inaktivierten, geschlossenen Zustand in den aktivierbaren Zustand benötigt) von rund 0,5 ms noch eine **relative Refraktärzeit** (Zeit, die eine Konformationsänderung aller Kanäle benötigt; in der die Schwellschpannung größer ist) von rund 3,5 ms hinzukommt. [3]



Dabei werden drei Phasen unterschieden, die die neuronale Zellmembran während eines Aktionsimpulses durchläuft: Die Depolarisation, die Repolarisation und die Hyperpolarisation. Bei der Depolarisation kommt es zur Nivellierung der Ruhemembranspannung. Wird die Schwellspannung unterschritten, öffnen sich zunächst vorwiegend Natriumkanäle. Da durch die Öffnung von Natriumkanälen die Zellmembran weiter depolarisiert wird, wird damit auch die Öffnung weiterer Kanäle begünstigt, es kommt zu einer Kettenreaktion. So kann sich die Membranspannung in kurzer Zeit stark ändern. Die Repolarisation ergibt sich dadurch, dass einige Natriumkanäle bereits im inaktivierten Zustand vorliegen, während die Zahl offener Kaliumkanäle weiter zunimmt. Die Membranspannung nähert sich wieder der Ruhemembranspannung. Wenn schließlich vorwiegend Kaliumkanäle geöffnet sind, kommt es zur Hyperpolarisation, einer zusätzlichen Polarisation über die Ruhemembranspannung hinaus.

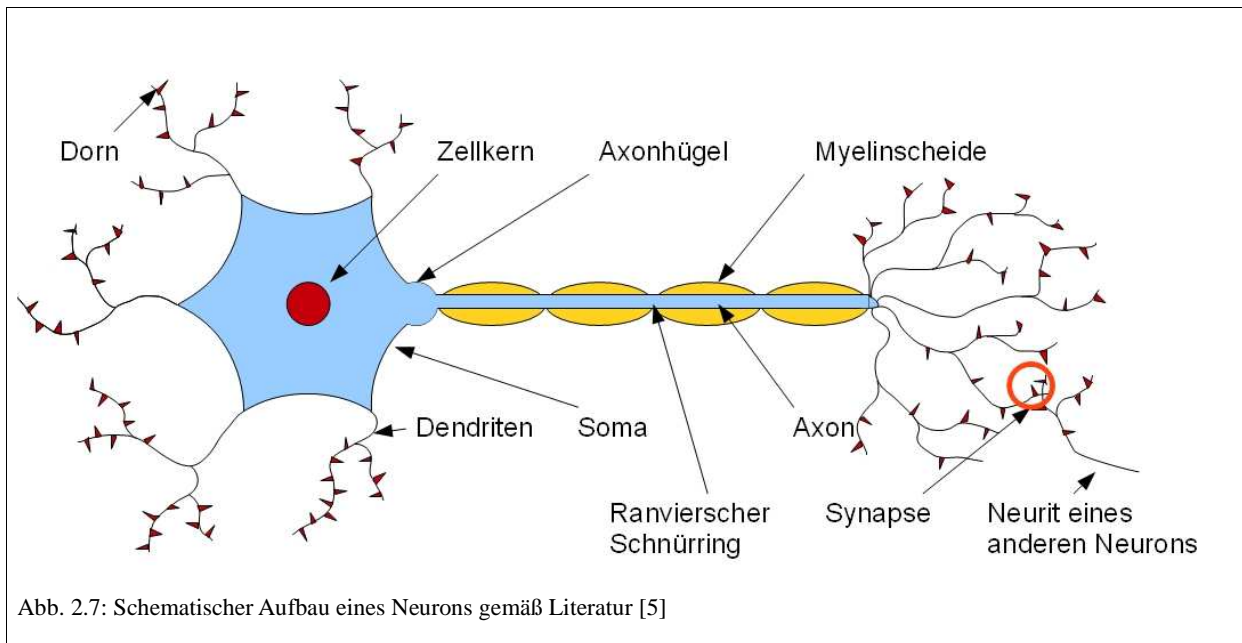
Für die Funktionsweise rezeptorgesteuerter Ionenkanäle gilt Ähnliches, jedoch wird hier die Konformationsänderung über Rezeptoren für spezifische Neurotransmitter gesteuert. Diese sind vor allem im Bereich der **Synapse** (Verbindungsstelle zweier Neuronen) von Bedeutung, die im Hinblick auf die neuronale Signalausbreitung noch genauer beleuchtet wird.

2.1.2 Neuronale Signalausbreitung

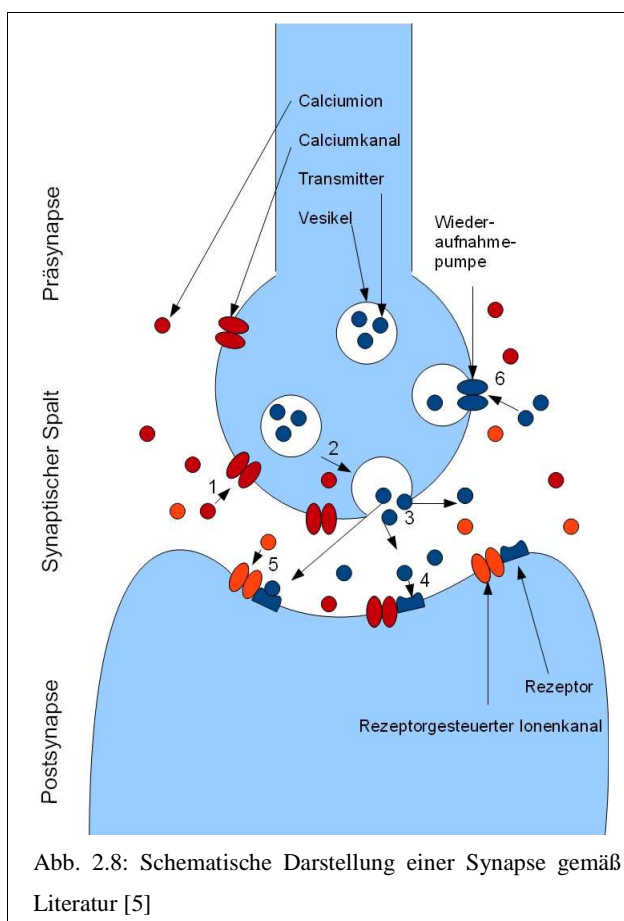
Um die Funktion eines Neurons zu verstehen und so den Informationsgehalt eines neuronalen Signals ausschöpfen zu können, muss etwas genauer auf die neuronale Signalausbreitung eingegangen werden. Dazu ist es zweckmäßig, sich zunächst den stark spezialisierten Aufbau eines Neurons vor Augen zu führen:

Aufbau eines Neurons

Ein typisches Neuron ist aus **Dendriten** (sich verzweigende Fortsätze, die die Eingänge des Neurons darstellen), dem **Soma** (Zellkörper ohne Fortsätze) und dem **Axon** (faserartiger Fortsatz, der den Ausgang des Neurons darstellt) aufgebaut (siehe Abb. 2.7). An den unzähligen **Dornen** (Fortsätze der Dendriten und Axone) befinden sich wiederum unzählige **Synapsen** (Verbindungsstelle zweier Neuronen). Das Soma beinhaltet verschiedene Organellen, die alle für die Funktion des Neurons nötigen Stoffe produzieren. Der **Axonhügel** (Verdickung am Soma, welcher das Axon entspringt) bildet den Übergang zum Axon. Das Axon wiederum kann je nach Zelle beeindruckende Längen erreichen (im Rückenmark über 1 Meter) und ist dazu von einer Isolationsschicht aus **Myelinscheiden** (von Hüllzellen produziertes Myelin) und **Ranvierschen Schnürringen** (Spalt zwischen zwei Myelinscheiden) umgeben. Generell sind Neuronen im lebenden Organismus in ein Gewebe aus **Gliazellen** (Stützzellen) eingebettet. Hierzu zählen auch die oben erwähnten Hüllzellen.



Die Synapse



An der Synapse wird die **Präsynapse** (Endköpfchen an einem Dorn des Axons) eines Neurons mit der **Postsynapse** (Endköpfchen an einem Dorn eines Dendriten) eines anderen Neurons verbunden. Die Funktion der Synapse ist in Abb. 2.8 skizziert.

Gelangt ein Aktionsimpuls zur Präsynapse, öffnen sich die dort befindlichen spannungsgesteuerten Calciumkanäle (1). Das Einstromen der Calciumionen bewirkt eine Entleerung der in Vesikeln gelagerten Transmitter in den synaptischen Spalt (2 und 3). Diese Transmitter wiederum aktivieren in der Postsynapse vorhandene rezeptorgesteuerte Ionenkanäle, wodurch die postsynaptische Zellmembran je nach Art der aktivierten Ionenkanäle de- bzw. hyperpolarisiert wird (4 und 5). Die Neurotransmitter werden anschließend über Wiederaufnahmepumpen zurück in die Präsynapse befördert (6). [5]

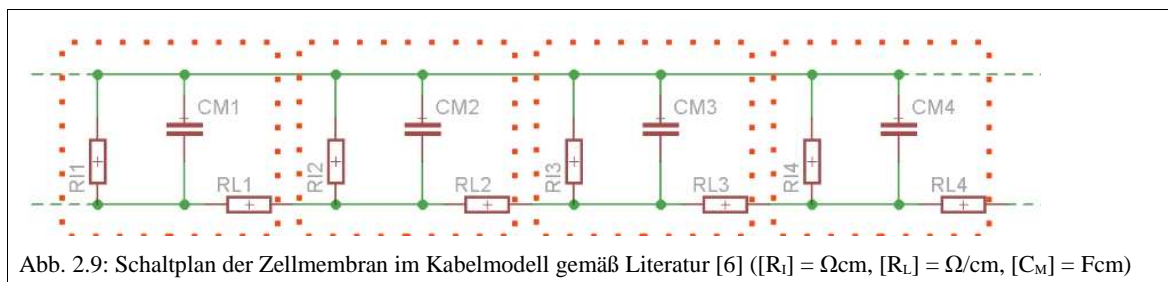
Aus der Aktivierung der rezeptorgesteuerten Ionenkanäle resultiert ein **exzitatorischer** (anregender) bzw. **inhibitorischer** (hemmender) **postsynaptischer**

Potentialunterschied, kurz **EPSP** bzw. **IPSP**. Dieser reicht nur in wenigen Fällen aus, um einen Aktionsimpuls auszulösen. Allerdings besitzt ein Neuron etliche Synapsen, ja sogar etliche synaptische Verbindungen zu ein und demselben Nachbarneuron, wobei jede Synapse eine andere Effektivität hat.

Wichtig ist nun, dass die chemische Signalausbreitung durch den synaptischen Spalt (~20 nm) wesentlich länger dauert als die elektrische Signalausbreitung innerhalb ein und desselben Neurons, ganz unabhängig von der zurückgelegten Weglänge (bis zu 1 m!). Dies ist besonders deswegen interessant, weil es auch elektrische Synapsen gibt, wo über sogenannte Gap junctions (Zell-Zell-Membrankanäle) der Kontakt zum nächsten anliegenden Neuron hergestellt wird. Eine chemische Synapse kann jedoch erstens hormonell gesteuert werden, zweitens kann auch die zeitliche Verzögerung über die Größe des synaptischen Spalts recht gut abgestimmt werden. Diese zeitliche Verzögerung ist von fundamentaler Bedeutung für die Funktion eines Neurons, denn so hat das Neuron ein zeitliches Fenster, in dem es einen Aktionsimpuls senden kann oder nicht – **Alles-oder-nichts-Prinzip**. Dies soll anhand der Impulsweiterleitung entlang des Neurons im Detail erläutert werden.

Impulsweiterleitung entlang der Zellmembran

Die Impulsweiterleitung entlang der Zellmembran lässt sich mit Hilfe von Ionenströmen erklären. Zur Simulation der Leiteigenschaften der Zellmembran wird meist das **Kabelmodell** (siehe Abb. 2.9) mit seinen elektrisch passiven Eigenschaften angewendet. Darin wird die Zellmembran als eine sich in gleichartigen Flächensegmenten wiederholende Struktur aufgefasst. In diesem Modell werden weder Ionenpumpen berücksichtigt noch die einzelnen spezifischen Ionenkanäle. Diese werden vereinfacht im Widerstand eines Flächensegments bei der elektrischen Leitung durch die Zellmembran (R_I) zusammengefasst. Entlang der Zellmembran besitzt ein Flächensegment einen anderen Widerstand (R_L), welcher sich wie gezeigt wird aus dem spezifischen Widerstand des intrazellulären Mediums ergibt.



Eine lokale Änderung der Membranspannung (δU_0) im ersten Segment bewirkt demnach eine Änderung der Membranspannung (δU_M) in allen weiteren Segmenten, wobei der Betrag gemäß Gl. 4 vom Abstand (x) der Segmente abhängt [6].

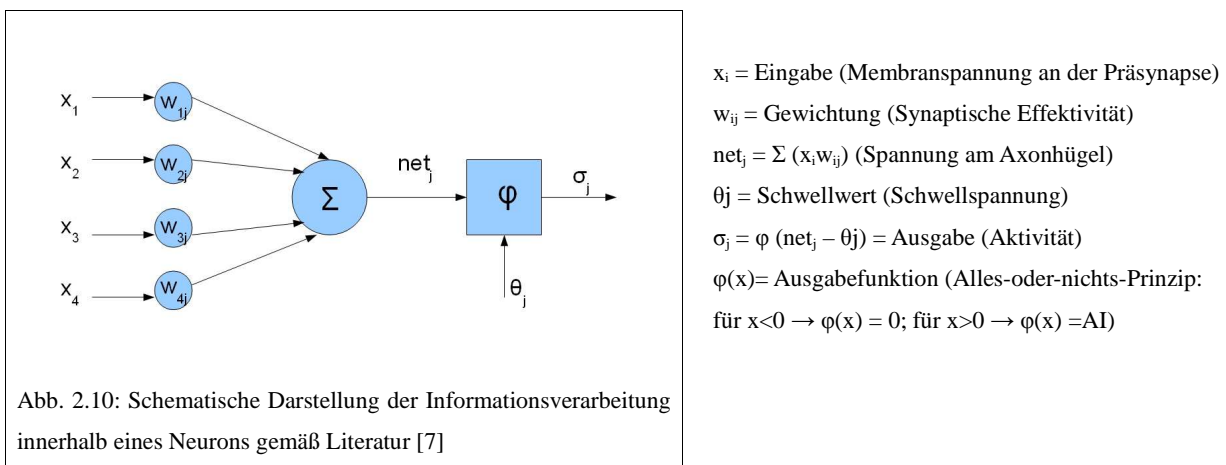
$$\delta U_M = \delta U_0 e^{\frac{-x}{\lambda}} \quad \text{Gl. 4}$$

Das Resultat zeigt eine mit dem Abstand exponentiell abfallende Impulsweiterleitung. Die charakteristische Größe λ weist die Dimension einer Länge auf und hängt gemäß Gl. 5 vom Verhältnis der richtungsabhängigen Widerstände eines Segments der Zellmembran ab. Unter der Annahme eines von der Zellmembran umgebenen zylindrischen Leiters mit Radius r und spezifischem Widerstand $\rho = r^2\pi R_L$ sowie einem Membranwiderstand $R_M = 2\pi r R_I$ lässt sich das Kabelmodell anschaulich auf die passiven elektrischen Eigenschaften eines Axons anwenden.

$$\lambda = \sqrt{\left(\frac{R_I}{R_L}\right)} \approx \sqrt{\left(\frac{r R_M}{2 \rho}\right)} \quad \text{Gl. 5}$$

Am Axonhügel ist durch die Beschaffenheit der Zellmembran die zur Auslösung eines Aktionsimpulses notwendige Schwellenspannung am geringsten. Auch wenn die EPSPs und IPSPs hier gedämpft eintreffen, stellt der Axonhügel den Entstehungsort für Aktionsimpulse dar.

Dabei wird ein Aktionsimpuls genau dann ausgelöst, wenn annähernd gleichzeitig eintreffende PSPs in Summe die Schwellenspannung überschreiten. Die Forderung nach annähernder Gleichzeitigkeit ist hierbei entscheidend, denn das Neuron stellt ja mit der Zeit seine Ruhemembranspannung wieder ein. Ein Neuron kann somit als **Koinzidenzdetektor** (misst gleichzeitiges Auftreten verschiedener Umstände, in diesem Fall neuronaler Aktivität) verstanden werden. Mit der Vereinfachung, dass die Aktivität der Synapsen in gewissen Zeitschritten abgetastet werden, lässt sich ein Neuron auch relativ einfach simulieren. (siehe Abb. 2.10) [7]

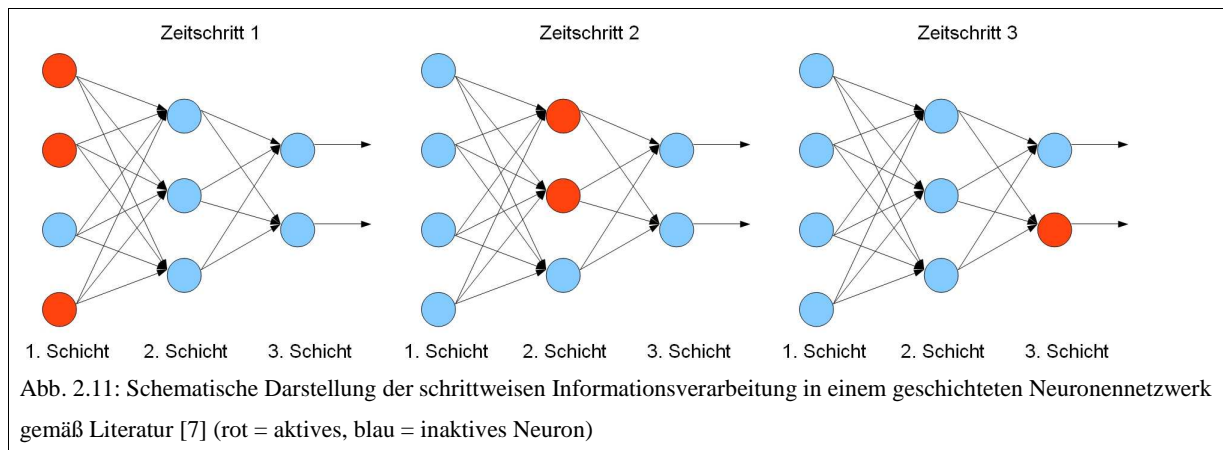


Um das Axon eines Neurons im peripheren Nervensystem befinden sich durch Ranviersche Schnürringe getrennte Myelinscheiden. (siehe Abb. 2.8) Einmal ausgelöst, pflanzt sich ein Aktionsimpuls entlang des Axons unter Auslösung immer neuer Aktionsimpulse sprunghaft von einem Schnürring zum nächsten fort. So kann ein Aktionsimpuls in myelinisierten Nervenfasern energiesparend auch über weite Distanzen ungehindert zum Ziel gelangen. Aufgrund der dabei auftretenden Refraktärzeit ist außerdem gewährleistet, dass sich ein Aktionsimpuls nur in eine Richtung fortpflanzt.

Nun geschieht die neuronale Informationsverarbeitung nicht in einem einzelnen Neuron, sondern in einem **Neuronennetzwerk** (Verbund mehrerer Neuronen).

Neuronennetzwerke

Das zeitliche Zusammenwirken mehrerer Neuronen ist in Neuronennetzwerken beschreibbar. Die gesendete Information eines Neurons steckt in seiner Aktivität (siehe Abb. 2.10), welche formal binär (**Alles-oder-nichts-Prinzip**) und zeitlich diskret (Verarbeitung in Zeitschritten) ist und zusammen mit den Aktivitäten anderer Neuronen ein **Aktivitätsmuster** bildet. Ein **Neuronennetzwerk** (Verbund mehrerer Neuronen) arbeitet meist in Verarbeitungsschichten. So stellt das Aktivitätsmuster der ersten Verarbeitungsschicht den Eingang für die zweite Verarbeitungsschicht dar, das Aktivitätsmuster der zweiten Verarbeitungsschicht den Eingang für die dritte Verarbeitungsschicht usw. (siehe Abb. 2.11).



So kann das Netzwerk selbst komplexe Probleme lösen. Die Effektivität einer chemischen Synapse (w_{ij}) kann zudem über die Größe des synaptischen Spalts verändert werden kann. Dafür sind komplexere Vorgänge im Netzwerk notwendig, die unter dem Begriff „Lernen“ zusammengefasst werden. Dies geschieht unter anderem über hormonelle Steuerung. Dabei wird davon ausgegangen, dass jene Synapsen effektiver werden, welche öfters zu einem Aktionsimpuls beigetragen haben. Für die Simulation der Veränderung der Effektivität einer Synapse (δw_{ij}) wird meist die **Hebb'sche Lernregel (Gl.6)** für einen Lernschritt angewendet. Neben der Korrelation der Membranspannung an der betreffenden Präsynapse (x_i) und der Aktivität des darauf folgenden Neurons (σ_j) tritt darin die Lernrate (ξ) als normierender Faktor für die Änderung der synaptischen Effektivität in einem Lernschritt auf.

$$\delta w_{ij} = x_i \sigma_j \xi \quad \text{Gl. 6}$$

Dabei ist wiederum zu beachten, dass bei vernetzten Neuronen die Spannungen an den Präsynapsen den Aktivitäten der Neuronen in der vorhergehenden Schicht entsprechen. Jedoch kann jedes Neuron auch durch einen künstlichen Stimulus aktiviert werden. Dies kann entweder direkt elektrisch geschehen oder durch gezielte chemische Eingriffe. Außerdem kann neuronale Aktivität mit einer Elektrode an der Zellmembran gemessen werden [8].

2.2 Ableitung neuronaler Aktivität

Die Ableitung neuronaler Aktivität gelingt mit Hilfe von Elektroden, die in Kontakt mit der Zellmembran stehen. Deswegen soll die **Zelladhäsion** (Haftung einer Zelle) auf den Elektroden behandelt werden (siehe Kap. 2.2.1). Da beim Einsatz von Elektroden Phasengrenzeneffekte zu berücksichtigen sind, werden diese im weiteren kurz erläutert (siehe Kap. 2.2.2). Außerdem sollen die Prioritäten bei der Wahl der Elektrodenkonfiguration (siehe Kap. 2.2.3) sowie die Vor- und Nachteile eines Mikroelektrodenarrays für die Messung neuronaler Aktivität (siehe Kap. 2.2.4) geklärt werden.

2.2.1 Zelladhäsion von Neuronen in vitro

Für reproduzierbare Messergebnisse ist es von Vorteil, Neuronen **in vitro** (außerhalb des Organismus) zu kultivieren. Dazu ist es notwendig, auf dem **Substrat** (dem zu beschichtenden Untergrund) eine Matrix aufzubringen, an welcher die Neuronen haften können. Diese Matrix simuliert die natürliche Umgebung (Stützgewebe), welche für die Funktionalität der Neuronen von großer Bedeutung ist. Außerdem wird dadurch die Position der Neuronen in einer Ebene fixiert, was besonders die reproduzierbare Auswertung von Langzeitstudien erleichtert bzw. erst ermöglicht.

Für die Zelladhäsion sind die **Integrine** (eine Gruppe von Transmembranproteinen) verantwortlich. Diese können beispielsweise an die **RGD-Sequenzen** (Arginin – Glycin – Asparaginsäure) des im organischen Gewebe vorhandenen Fibronektins binden. In vitro werden dabei meist polare Adhäsionsvermittler auf den Deckgläsern aufgetragen.

Die Haftung des Adhäsionsvermittlers kann wiederum durch vorangehende Ladung des Substrats begünstigt werden (siehe Abb. 2.12). Außerdem wird die Zelladhäsion durch eine aufgeraute Oberfläche begünstigt, da sich so mehr mögliche Bindungsstellen bieten. Dies gilt insbesondere für jene Elektroden, mit denen die neuronale Aktivität abgeleitet werden soll. [9]

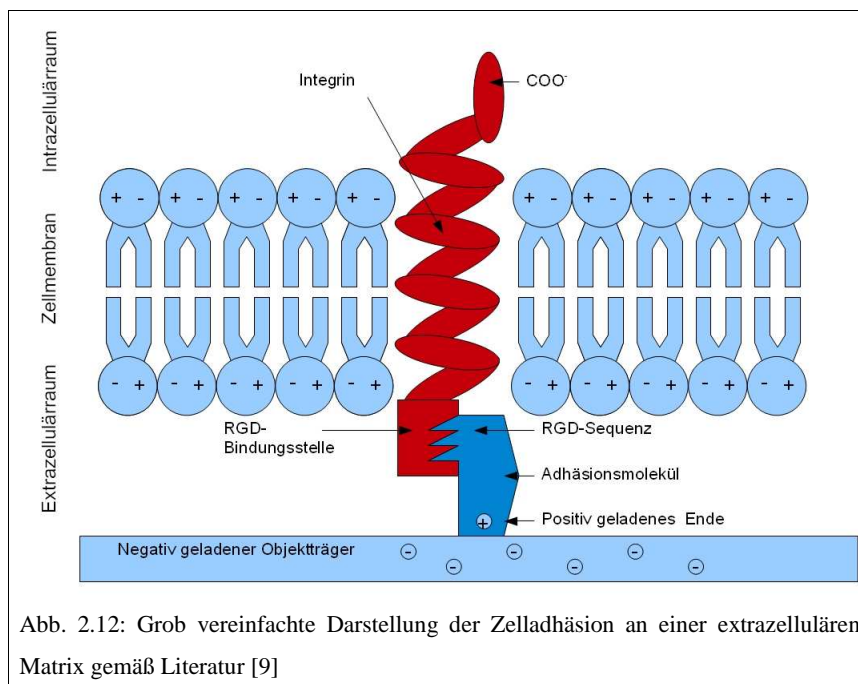


Abb. 2.12: Grob vereinfachte Darstellung der Zelladhäsion an einer extrazellulären Matrix gemäß Literatur [9]

2.2.2 Phasengrenze Elektrode – Elektrolyt

Da ein Neuronennetzwerk, um zu funktionieren, stets von einem **Elektrolyten** (ionenhaltige, elektrisch leitfähige Flüssigkeit; das Nährmedium) umgeben ist, muss neuronale Aktivität mit Hilfe von **Elektroden** (elektrische Leiter in Kontakt mit einem Elektrolyten) abgeleitet werden.

Eine Metallelektrode des Metalls M im Elektrolyten stellt eine Elektrode erster Art dar. In Analogie zur Wirkung der passiven Ionenkanäle diffundieren Metallionen durch die Phasengrenze, bis die daraus resultierende Spannung den Konzentrationsgradienten ausgleicht. Nun wird Ladung bei gleichzeitiger Strukturveränderung transportiert. Um diese zu berücksichtigen, wird das **Standardelektrodenpotential** E_0 (Das Elektrodenpotential unter Standardbedingungen) eingeführt, wobei das Standardelektrodenpotential der Normal-Wasserstoffelektrode als Bezugspotential ($E_0=0$) gewählt wird. Für die Berechnung des Elektrodenpotentials E wird wiederum die Nernst-Gleichung (siehe Gl. 7) verwendet.

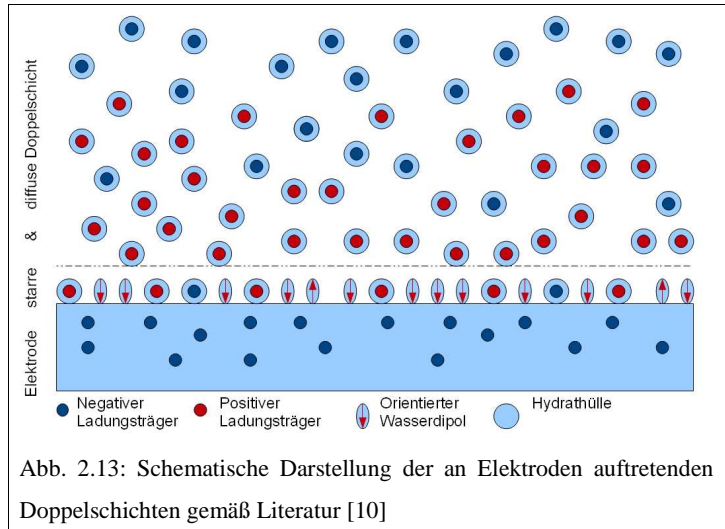


Abb. 2.13: Schematische Darstellung der an Elektroden auftretenden Doppelschichten gemäß Literatur [10]

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln \prod (y_i [X_i])^{v_i} \quad \text{Gl. 7}$$

An der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt bildet sich eine starre (**Helmholtz-**) **Doppelschicht** aus **adsorbierten** (angelagerten) Teilchen sowie eine darauf folgende diffuse (**Gouy-Chapman-**) **Doppelschicht** aus gelösten Teilchen aus (siehe Abb. 2.13) [10].

Dabei handelt es sich um ein dynamisches System, bei dem die Konzentrationen untereinander wechselwirken. Das Elektrodenpotential bleibt somit nicht konstant. Die Doppelschichten wiederum sind recht komplex. In elektrischen Modellen werden sie meist als RC-Glieder (Kondensatoren parallel zu Widerständen) dargestellt.

Eine Metallelektrode, umhüllt von einem schwer löslichen Salz des Metallions, stellt eine Elektrode zweiter Art dar. Das Elektrodenpotential hängt von der Konzentration der Kationen im Salz ab, welche über das **Löslichkeitsprodukt** (für gesättigte Lösungen im Gleichgewicht gilt $L = [\text{Kationen in Lösung}] \cdot [\text{Anionen in Lösung}] = \text{konstant}$) an die Konzentration von Anionen im Elektrolyten gekoppelt ist. Ist die Lösung – wie im Falle von schwerlöslichen Salzen – schnell gesättigt, dann bleibt die Konzentration der gelösten Anionen konstant, wodurch auch das Elektrodenpotential konstant bleibt. Dadurch eignen sich Elektroden zweiter Art als Referenzelektroden. Sie sind per Definition ebenfalls von einer Doppelschicht umgeben. Für die auftretenden Reaktionen sei auf Tabelle 2.2 verwiesen.

Je nach Anwendungsgebiet werden Elektroden aus unterschiedlichen Materialien benötigt. Als Beispiel sei hier die Ag/AgCl-Elektrode (Silber/Silberchlorid-Elektrode) genannt, da diese aufgrund der Stabilität ihres Elektrodenpotentials in Kochsalzlösungen häufig für physiologische Messungen eingesetzt wird. Doch auch die Messweise bedingt die Wahl der Materialien, aus denen die Elektroden gefertigt werden.

2.2.3 Methoden der Ableitung

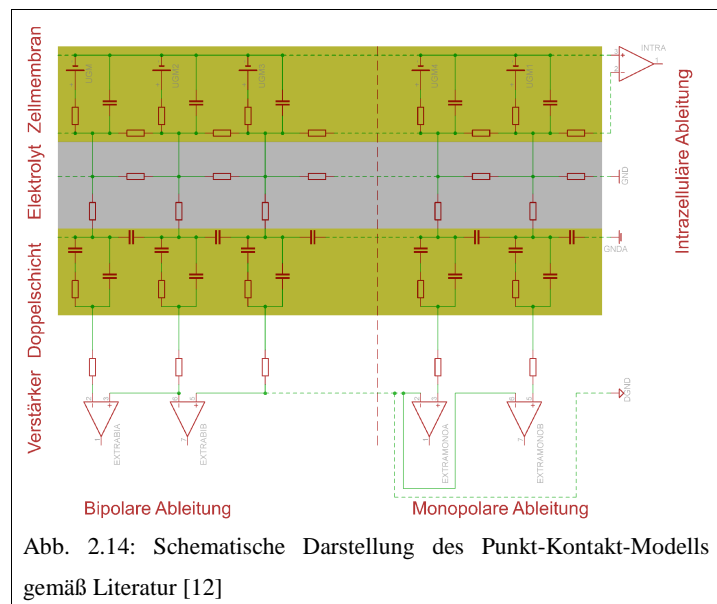
Je nach Positionierung und Beschaltung der Elektroden werden verschiedene Messweisen unterschieden, die den Einsatzbereich des Messsystems grob definieren:

- Bei **intrazellulärer Ableitung** wird eine Elektrode außerhalb der Zellmembran und eine zweite Elektrode innerhalb der Zellmembran angebracht. Das Anbringen der Ableitungen erfolgt üblicherweise manuell und erfordert deswegen erheblichen Aufwand. Außerdem werden die Neuronen beim Eindringen der Elektrode zerstört. Als besonderes Beispiel sei hier die **Patch-Clamp-Technik** genannt, mit deren Hilfe das elektrische Verhalten einzelner Ionenkanäle untersucht werden kann.
- Bei der **extrazellulären Ableitung** werden beide Elektroden außerhalb der Zellmembran angebracht. Auch hier entsteht mit einem AI durch Ladungsträgerverschiebung ein Spannungsunterschied, wobei der weitaus größere Teil an der Zellmembran abfällt. Deshalb müssen die Signale bei dieser Variante mehr verstärkt werden. Deswegen ist die extrazelluläre Ableitung auch von vornherein ungenauer, was allerdings für die Visualisierung von Aktivitätsmustern belanglos sein sollte [11]

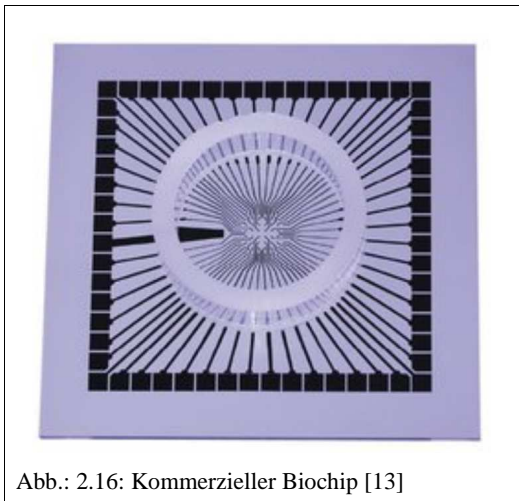
Die komplexen Verhältnisse werden im Punkt-Kontakt-Modell nach Weis [12] deutlich (siehe Abb. 2.14). Dabei werden das Kabelmodell (siehe Kap. 2.1.2), die elektrochemischen Doppelschichten (siehe Kap. 2.2.2) sowie ein elektrischer Widerstand des Elektrolyten berücksichtigt.

Meist ist es von Interesse, mehrere extrazelluläre Elektroden einzusetzen. Je nach Art der Verschaltung wird zwischen **monopolarer Ableitung** (alle Elektroden messen die Spannung zu ein und derselben Referenzelektrode = stabiles Potential) und **bipolarer Ableitung** (jede Elektrode misst die Spannung zur vorangehenden Elektrode) unterschieden.

Bei bipolarer Ableitung sind dabei wegen der herausragenden Gleichtaktunterdrückung hauptsächlich **Differenzenverstärker** bzw. **Instrumentenverstärker** geeignet, bei monopolarer Ableitung genügen einfachere Verstärkerschaltungen. Für extrazelluläre Ableitung von Aktivitätsmustern ganzer Populationen empfiehlt sich ein Mikroelektrodenarray. Allerdings ist sein Einsatzbereich begrenzt, weil die Elektrodenanordnung im Vorhinein festgelegt wird.



2.2.4 Einsatzbereich eines Mikroelektrodenarrays



Ein Mikroelektrodenarray (**MEA**) ist eine üblicherweise symmetrische fixe Anordnung vieler kleiner (Mikro-)Elektroden auf einem nicht leitenden Trägersubstrat (siehe Abb. 2.15 [13]). Auch Neuronale Aktivität kann mit einem MEA abgeleitet werden, um Aktivitätsmuster des kultivierten Neuronennetzwerks aufzuzeichnen. Im Besonderen sind die Aktivitätsmuster bei reproduzierbarem Stimulus unter Einfluss pharmazeutischer Substanzen (welche die Aktivität der Synapsen verändern) von Interesse. Durch gezielte und regelmäßige Stimulation lässt sich schließlich auch das Wachstum der Neuronen beeinflussen (→ siehe Kap. 2.1.2).

Für In-vitro-Messungen haben sich flache, runde Elektroden etabliert. [14] Damit die Neuronen direkt auf dem MEA kultiviert werden können, muss eine **Zellkulturkammer** (Gefäß für das Nährmedium) abdichtend mit dem MEA verbunden werden. Diese Verbindung soll in dieser Arbeit im weiteren als **Biochip** (MEA mit Zellkulturkammer) bezeichnet werden. Die Anordnung der Elektroden auf dem MEA fertigungstechnisch festgelegt. Der Einsatzbereich hängt stark von der Größe und Verteilung sowie der Anzahl der Elektroden ab.

Mit dem Durchmesser der Elektrode wächst die potentielle Kontaktfläche zu einem Neuron, allerdings auch die Wahrscheinlichkeit, dass von der gleichen Elektrode die Aktivität mehrerer Neuronen gleichzeitig gemessen wird. Kleine Elektroden hingegen geben ein örtlich schärferes Bild ab, jedoch sind sie von den Phasengrenzeffekten und dem daraus resultierenden Rauschen stärker betroffen. Mit der Größe der Elektrode steigt also auch die Stabilität ihres Elektrodenpotentials.

Für die Qualität des MEAs ist nun das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. Signal-noise-relation; **SNR**) entscheidend, wobei keine proportionale Abhängigkeit vom Durchmesser der Elektroden angenommen werden kann. Je nach Anwendungsbereich variieren auch die Abstände der Elektroden auf den MEAs. Grundsätzlich sollten möglichst viele Elektroden möglichst dicht auf dem MEA angeordnet sein, um Aussagen über einzelne Neuronen treffen zu können. Für Aussagen bezüglich eines ganzen Netzwerks erscheint es jedoch zweckmäßig, bei festgelegter Elektrodenzahl größere Abstände zu wählen.

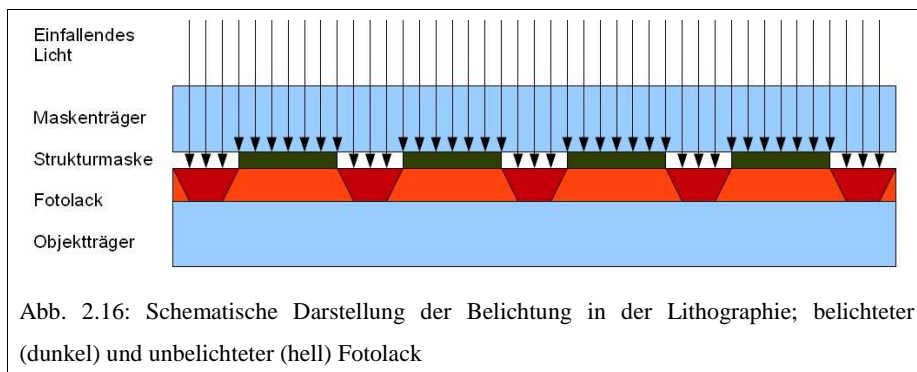
Die Verteilung der Elektroden wiederum kann sehr spezifisch auf die Problemstellung und die Verteilung der Neuronen abgestimmt sein. Die Verteilung der Neuronen schließlich kann über eine zusätzliche Strukturierung des Zellkulturkammerbodens beeinflusst werden. So bietet eine raue Oberfläche mehr Halt für ein Neuron, tiefe Grabenstrukturen mit dünnen Verbindungskanälen auf der Oberfläche des Trägersubstrats können aber auch ganze Gebiete im Netzwerk trennen [15], wobei auch In-vitro Zusammenhänge zwischen der örtlichen Lage eines Neurons und seiner Position als Knoten im Neuronennetzwerk hergestellt bzw. bekräftigt werden können, um aufschlussreichere Aktivitätsmuster zu erhalten.

2.3 Mikroelektronische Beschichtungsverfahren

Da in dieser Arbeit MEAs zur Ableitung neuronaler Aktivität prozessiert wurden, soll im Weiteren auf die relevanten Verfahren der Mikrostrukturherstellung eingegangen werden. Besonderes Interesse gilt hierbei der Lithographischen Strukturierung (siehe Kap. 2.3.1) sowie plasmaunterstützten Beschichtungs- und Ätzverfahren (siehe Kap. 2.3.2).

2.3.1 Lithographische Strukturierung

Zur lithographischen Strukturierung einer Oberfläche wird zunächst ein spezieller **Fotolack** benötigt. Die wichtigsten Bestandteile von Fotolack sind Polymere (oder Harze), Lösungsmittel sowie eine lichtempfindliche Komponente. Der Lösungsmittelanteil verflüchtigt sich bei höheren Temperaturen, woraufhin der Fotolack aushärten kann. Die lichtempfindliche Komponente hat die Aufgabe, die Löslichkeit der mit spezifischer Wellenlänge belichteten Bereiche zu verändern, um den Fotolack mittels Belichtung durch eine **Lithographiemaske** (Strukturmaske auf Maskenträger) strukturieren zu können (siehe Abb. 2.16).



Bei einem **Positivresist** wird die Löslichkeit in einem Entwicklerbad durch die Belichtung erhöht, bei einem **Negativresist** wird sie gesenkt. Dazu wird nach der gleichmäßigen Rotationsbeschichtung (engl. **Spin-coating**) eines geeigneten Substrats der Resist vor der Belichtung (engl. **Softbake**) gebacken. Ein neuerliches Backen nach der Belichtung und nach dem entwickeln (engl. **Hardbake**) erhöht die mechanische Festigkeit der bereits strukturierten Lackschicht. Die spezielle Klasse der Image-Reversal-Lacke stellt eine Kombination von Positiv- und Negativresist dar. Wird der Fotolack zuerst gebacken und dann belichtet, werden in Analogie zum Positivprozess belichtete Bereiche löslicher. Anschließend können jedoch mit einem weiteren, sogenannten Umkehrbackschritt (engl. **Image-Reversal-Bake**) speziell belichtete Bereiche aushärten, was im Ergebnis einem Negativprozess entspricht. In einer folgenden Flutbelichtung wird der bisher unbelichtete Bereich löslich.

Die Löslichkeit bezieht sich natürlich immer auf die als **Entwickler** eingesetzte wässrige Lösung mit basischem pH-Wert. Bei der Entwicklung werden leichter lösliche Bereiche schneller entfernt. Daraus ergibt sich jedoch, dass aufgrund von unvermeidbaren Absorptions- und Streueffekten die Kantenneigung der entwickelten Lackstrukturen in beiden Fällen unterschiedlich ist.

Zu beachten ist, dass für eine anschließende Entfernung der strukturierten Lackschicht auch der ausgehärtete Fotolack für spezifische Lösungsmittel, sogenannte Remover, löslich bleiben muss. Beim **Lift-off-Prozess** löst sich mit der Entfernung der Lackschicht auch der auf dem Fotolack liegende Teil der nach der Lithographie aufgetragenen Schicht. So wird auch diese Schicht nach dem negativen Abbild der Lackschicht strukturiert. Die Lithographie wird meist nur als strukturgebendes Verfahren mit anderen Beschichtungsverfahren oder Ätzverfahren kombiniert, um die im organischen Lack erhaltenen Strukturen in eine anorganische Materialschicht zu übertragen [16].

2.3.2 Plasmaunterstützte Beschichtungs- und Ätzverfahren

In dieser Arbeit wurden Biochips mit Hilfe von plasmaunterstützten Beschichtungs- und Ätzverfahren prozessiert. Die relevanten Verfahren für diese Arbeit sind die **Kathodenzerstäubung** (auch **Sputtern**) sowie die **plasmaunterstützte chemische Gasphasenabscheidung** (engl. Plasma enhanced chemical vapour deposition; **PECVD**) als Abscheidungsverfahren und das **reaktive Ionenätzen** (engl. Reactive ion etching; **RIE**) als Ätzverfahren. Bei diesen Verfahren wird das Substrat in eine Vakuumkammer eingeschleust, und bis zum Erreichen des **Basisdrucks** Gas abgepumpt, um eine hohe Reinheit im Gasprozess zu erzielen. Anschließend wird die Kammer bis zum Erreichen des **Arbeitsdrucks** mit **Prozessgasen** gefüllt. Diese Atmosphäre wird mit Hilfe eines hochenergetischen elektromagnetischen Feldes (z.B. erzeugt durch ein Magnetron) ionisiert. Die Prozessgase werden dabei zum **Plasma** (Gas aus freien Ladungsträgern), wobei die Plasmaionen nun beschleunigt werden können. Als Prozessgase werden je nach Verfahren inerte **Arbeitsgase** und/oder **Reaktionsgase** eingesetzt (siehe Abb. 2.17) [17].

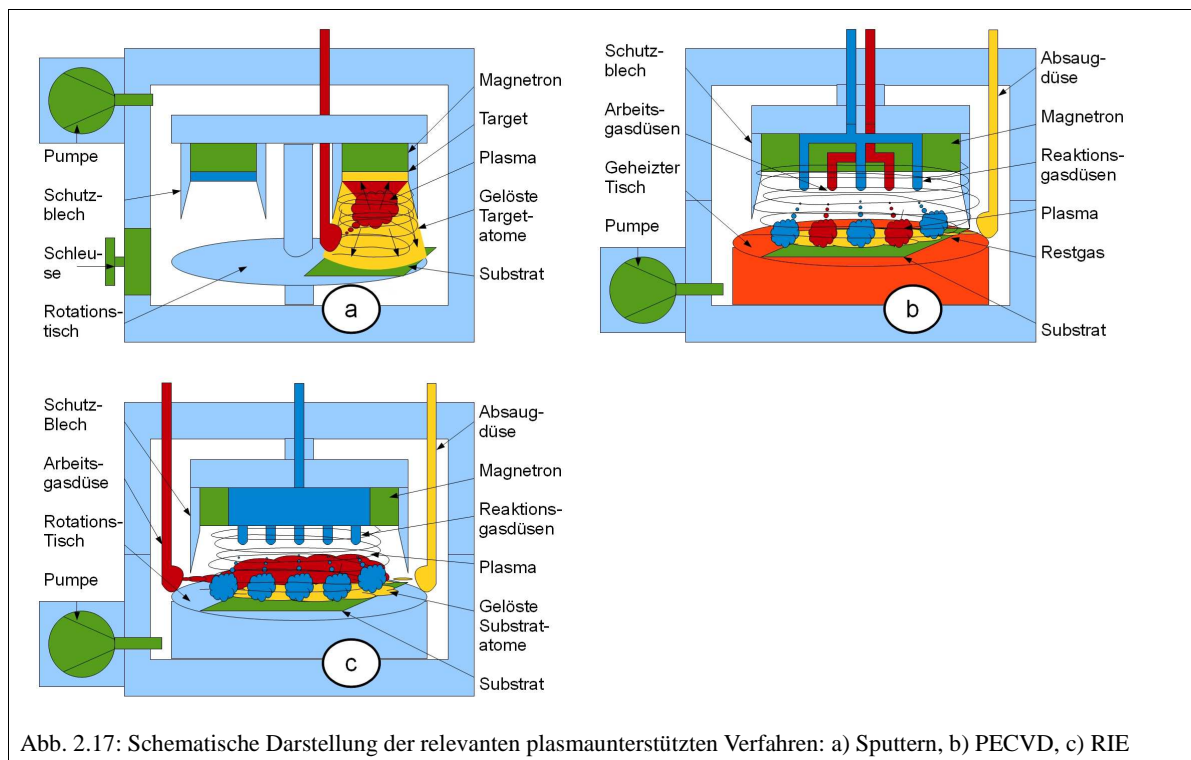


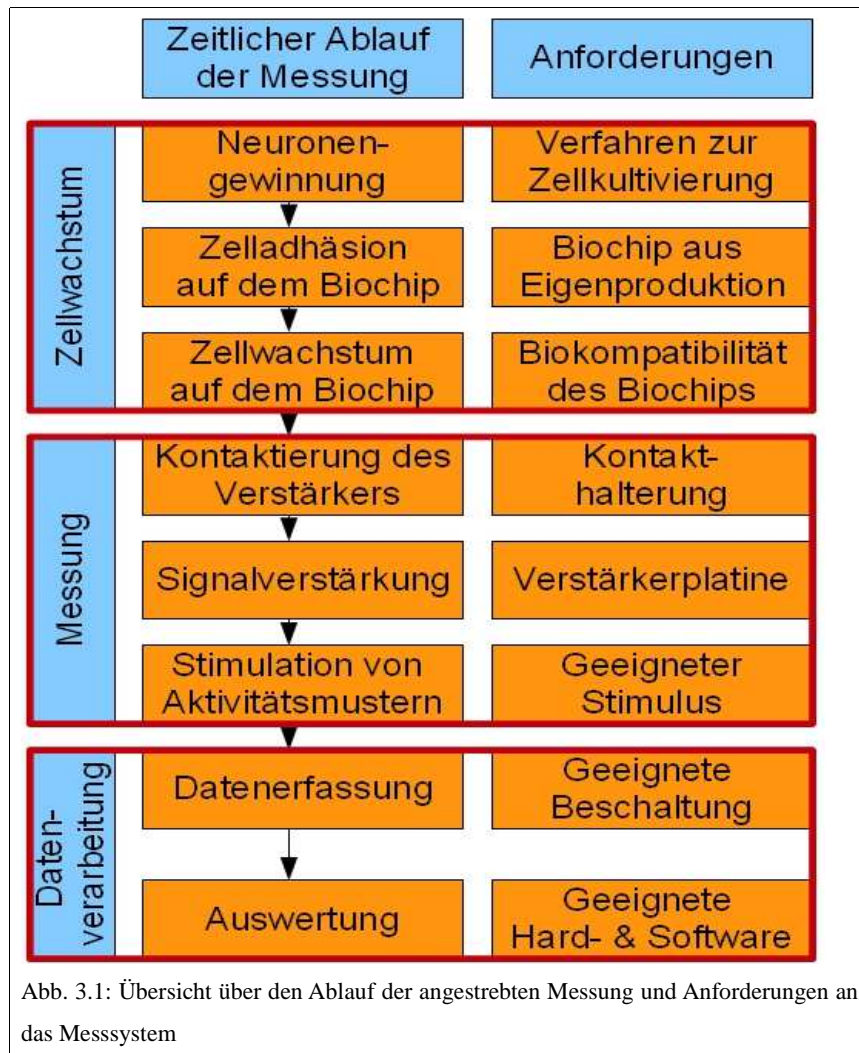
Abb. 2.17: Schematische Darstellung der relevanten plasmaunterstützten Verfahren: a) Sputtern, b) PECVD, c) RIE

- Beim Sputtern werden inerte Plasmaionen auf ein Target aus abzuschneidendem Material beschleunigt. Durch die Impulsübertragung werden aus dem Target Atome herausgelöst, die schließlich auf das Substrat treffen und zum Teil haften bleiben. So wird das Substrat mit Targetmaterial beschichtet (siehe Abb. 2.17a).
- Bei der PECVD werden inerte Arbeitsgase und Reaktionsgase gemischt. Durch die Ionisierung der Reaktionsgase sowie die Beheizung des Substrats wird die Abscheidung einer festen Phase am Substrat begünstigt (siehe Abb. 2.17b). Für die stöchiometrische Zusammensetzung der abgeschiedenen Isolationsschicht sind die Anteile der Reaktionsgase maßgebend.
- Der RIE-Prozess kombiniert physikalisches und chemisches Ätzen. Richtung Substrat beschleunigte Plasmaionen führen zum Auflösen bestehender Bindungen an der Oberfläche. Die Oberflächenatome können so leichter Molekülverbindungen mit dem Reaktionsgas eingehen und als Gas abgeführt werden (siehe Abb. 2.17c). Dabei sollten die chemischen Eigenschaften der Reaktionsgase auf die chemischen Eigenschaften der zu ätzenden Leiter- oder Isolationsschicht abgestimmt sein, sodass materialspezifisch geätzt werden kann. Ein spezieller RIE-Prozess ist das **Plasmaveraschen** bei dem ein Sauerstoffplasma gezündet wird. Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit sowohl zur Reinigung (besonders bezüglich organischer Rückstände) als auch der Hydrophilisierung von Oberflächen eingesetzt.

3 Messmethode

In dieser Arbeit soll ein Messsystem zur Ableitung elektrischer Aktivität neuronaler Zellkulturen erstellt werden. Dazu wird noch einmal der Ablauf der Messung im Hinblick auf die dafür benötigten Geräte festgehalten (siehe Abb. 3.1). Des Weiteren sollen die Zellkultivierung von Neuronen (siehe Kap. 3.1), die Biochip-Prozessierung (siehe Kap. 3.2) sowie der Aufbau des Messsystems (siehe Kap. 3.5) mit Kontaktierung (siehe Kap. 3.3) und Verstärkerschaltung (siehe Kap. 3.4) näher beschrieben werden. Die Produktion der Biochips umfasst dabei drei Bereiche, die im Folgenden unterschieden werden:

- Die Strukturierung von Mikroelektrodenarrays auf einem Trägersubstrat zur Ableitung elektrischer Signale
- Die Herstellung eines Mikrokanals auf dem Zellkulturkammerboden zum strukturierten Wachstum der Neuronen bzw. zum Isolieren von Axonen
- Die Herstellung der Zellkulturkammer zur Aufnahme des Nährmediums



3.1 Zellkultivierung von Neuronen

Gewinnung von Neuronen aus Gewebe (Primärkultur)

Da sich Neuronen nur unter gewissen Umständen und eher selten teilen, müssen für die Ableitung neuronaler Aktivität in vitro Zellen aus einem lebenden Organismus entnommen werden. Damit die Zellkulturen vergleichbar bleiben, sind die Tierart, der Stamm (Labortiere unterliegen einer ausgereiften Zucht) und das Alter des Versuchstiers sowie die ursprüngliche anatomische Herkunft der Neuronen von Bedeutung. Für weitere Versuche an lebenden Neuronen wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Sigismund Huck vom Hirnforschungsinstitut der Universität Wien Zellen des oberen Halsganglions (engl. Superior cervical ganglion; **SCG**) von Mäusen in einem frühen Entwicklungsstadium eingesetzt.

Das SCG befindet sich in der oberen Halsregion und kann nach abtrennen des Kopfes mit einem Mikrogewebeschnaider großzügig herausgeschnitten werden. Gewebereste werden anschließend im Wasserbad mit Pinzetten entfernt, und die Neuronen des Ganglions durch Trypsinierung in einem Reagenzglas vereinzelt. Trypsin löst Proteine, die auch die Neuronen miteinander verbinden, allerdings werden auch die Zellwände langsam aufgelöst. Um diesen Prozess zu stoppen, wird die Trypsinlösung rechtzeitig (nach 1 Minute) vorsichtig abgezogen und durch eine Lösung mit fetalem Kälberserum (engl. Fetal calb serum; **FCS**)-ersetzt. Das restliche Trypsin soll dabei durch FCS neutralisiert werden. Nach dieser Behandlung noch bestehende Verbindungen zwischen den Neuronen werden mittels Schütteln des Reagenzglases gelöst. Anschließend können die einzelnen Neuronen mit Hilfe eines optisch-elektronischen Systems zur Zellzahlbestimmung (Durchlaufzählung nach dem Widerstandsmessprinzip [18]) in gewünschter Menge abgefüllt werden.

Neuronenaussaat

Zu Beginn der Neuronenaussaat auf ein Deckglas wird dieses zur besseren Zelladhäsion mit einem Adhäsionsvermittler beschichtet (siehe Kap. 2.2.1). Die Deckgläser werden sterilisiert und zur Beschichtung zwei Stunden mit Poly-DL-Lysin (**PDL**) bedeckt, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen, über Nacht getrocknet und anschließend zur Beschichtung über Nacht mit Laminin bedeckt und vor der Aussaat zweimal mit Tyrode-Lösung gewaschen. Vor der Beschichtung mit Laminin können die Deckgläser bei 4 °C über mehrere Tage gelagert werden.

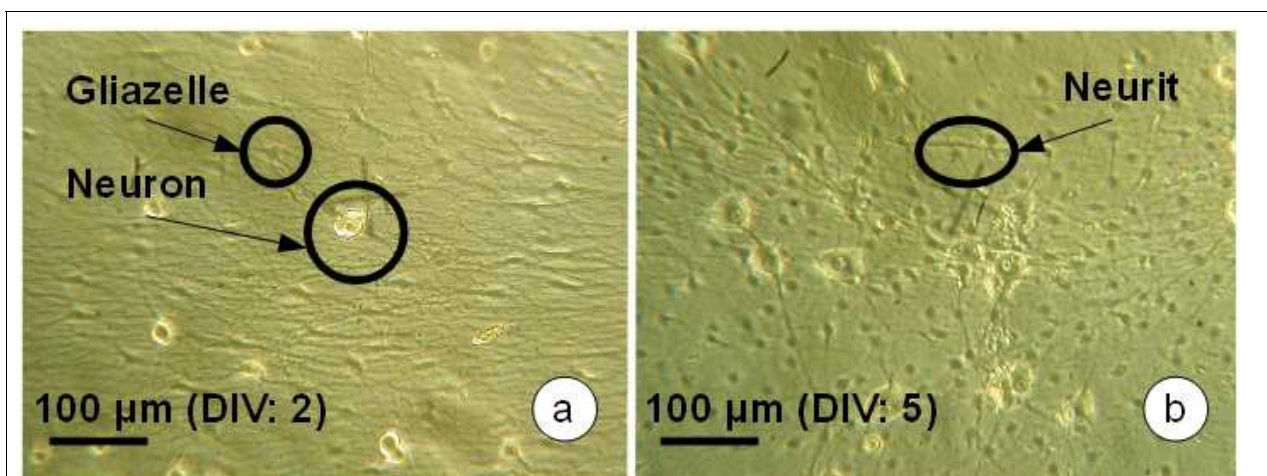


Abb. 3.2: In vitro kultivierte Neuronen: a) am zweiten Tag in vitro, b) am fünften Tag in vitro

Ist die Beschichtung mit Laminin abgeschlossen, werden in einem Glasring, der auf das Deckglas gestellt wird, eine bestimmte Menge an Neuronen ausgesät. Dazu werden die in der Neurologie gebräuchlichen Deckgläser [19] in eine sterile Petrischale gelegt, die nach der Aussaat mit Neurobasalem Medium (**NBM**) gefüllt wird. Mit dem Glasring wird die zu bewachsende Fläche räumlich beschränkt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Neuronen auch auf dem Mikroelektrodenarray der Biochips ausgesät. Die Biochips besitzen hierfür eine integrierte Zellkulturkammer, welche nicht nur die Funktion der Petrischale sondern auch des Glasringes ersetzen soll. Nach der Beschichtung des Biochips mit dem Adhäsionsvermittler können die Neuronen somit direkt in der Zellkulturkammer ausgesät werden.

In der Wachstumsphase sollen sich die vereinzelt Neuronen wieder zu einem funktionierenden Neuronengewebe vernetzen (siehe Abb. 3.2). In der natürlichen Umgebung sind Neuronen in einem Stützgewebe aus sogenannten Gliazellen durch zahlreiche Neuriten verbunden. In vitro soll ein ähnlicher Zustand hergestellt werden. Während der Wachstumsphase werden sie in einem Inkubator (siehe Abb. 3.3 [20]) gelagert, der durch konstante Temperatur und CO₂-Konzentration sowie den sterilen Innenraum ein lebensfreundliches Umfeld für die Zellen schafft. Aus diesem Umfeld sollten sie auch für die Messung der Ableitungen höchstens für 20 Minuten entnommen werden, ansonsten muss auf eine spezielle Außenlösung als Nährmedium zurückgegriffen werden. Das Medium sollte außerdem alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 5:7 (altes:neues Nährmedium) gewechselt werden. Tabelle 3.1 zeigt einen Überblick über das Verfahren zur Kultivierung der Neuronen [21]



Abb. 3.3: Inkubator [20]

Zellkultivierung von Neuronen in vitro	
<u>Neuronen:</u>	α5wt Mäuse P5, SCG-Zellen
<u>Sterilisation</u>	Dest. Wasser, 100 °C
<u>Adhäsionsvermittler:</u>	PDL und Laminin
<u>Ausgesäte Zelldichte:</u>	40.000/cm ² in NBM (5:7 wechseln)
<u>Deckglas</u>	Glass Cover Slides, siliconized
<u>Inkubator</u>	Thermo Scientific Heraeus Series 6000
<u>Temperatur / [CO₂]</u>	36 °C / 5,00 %

Tab. 3.1: Parameter zur Zellkultivierung von Neuronen in vitro

Präparation für den Transport

Um die Biokompatibilität der in der Mikroelektronik gebräuchlichen Materialien zu testen, wurden die in der Zellkultivierung etablierten Deckgläser gereinigt und mit den auf Biokompatibilität zu untersuchenden Materialien beschichtet (siehe Prozessparameter zur MEA-Prozessierung). Anschließend wurden die Deckgläser nach dem oben genannten Schema sterilisiert, beschichtet und mit Neuronen bestückt. Die Überprüfung der Vitalität der Neuronen erfolgte mit dem Lichtmikroskop. Da in der Neurologie jedoch fast ausschließlich Durchlichtmikroskope zum Einsatz kommen, mussten die Neuronen auf den (durch die Beschichtung nicht mehr durchsichtigen) Deckgläsern zum Transport fixiert werden. Dazu wird erst das Medium abgezogen, das Deckglas mit phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline; **PBS**) zweimal 5 Minuten gewaschen, und zur Fixierung der Neuronen 20 Minuten mit 2%iger Paraformaldehyd-Lösung bedeckt. Anschließend wird ein Deckglas dreimal 5 Minuten mit PBS und 10 Minuten mit Milli-Q-H₂O gewaschen und mit 108562 Aquatex zwischen zwei Deckgläsern luftdicht

verklebt. Durch das Fixiermittel erhalten die Proben eine rötliche Färbung und Lufteinschlüsse im Fixiermittel werden in mikroskopischen Aufnahmen als Artefakte wahrgenommen (siehe Abb. 3.4). Aus den geeignetsten Materialien sollen anschließend die MEAs prozessiert werden.

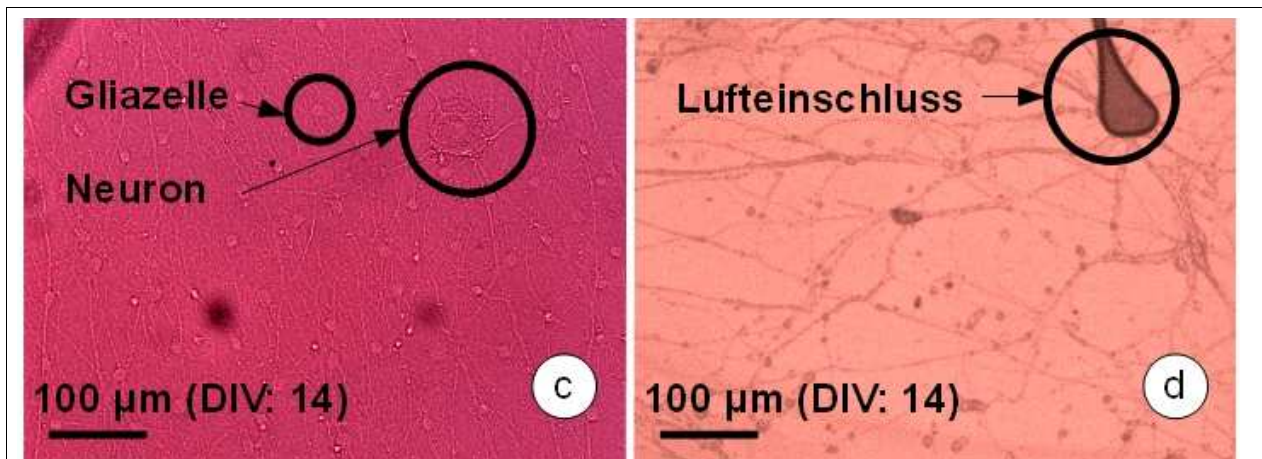


Abb. 3.4: Am vierzehnten Tag in vitro fixiertes neuronales Zellgewebe: a) gesundes Gewebe, b) Lufteinschluss im Fixiermittel

In der Zellkultivierung eingesetzte Lösungen und Dosierung			
<u>Ausgangsstoff</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Gebrauchslösung</u>	<u>Dosierung</u>
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Standardlösung	Standardlösung	vernachlässigbar
Trypsin	Reinstoff	0,25 % in PBS	30 µl/cm ²
Neurobasales Medium (NBM) Gibco 108880-22	Unverdünnt	+ Zusatzstoffe	500 µl/cm ²
Fetales Kälberserum (FCS)	Aus Kälberföten	10 % in NBM	~ 100 µl/cm ²
PDL hydrobromide Sigma P-1458	100 mg in 10 ml Wasser	0,25 % in Wasser	100 µl/cm ²
Laminin Cultrex mouse Cat 3400-010-01	1 mg in 9 ml NBM	11 % in NBM	50 µl/cm ²
Tyrode-Lösung	Standardlösung	Ohne CaCl	vernachlässigbar

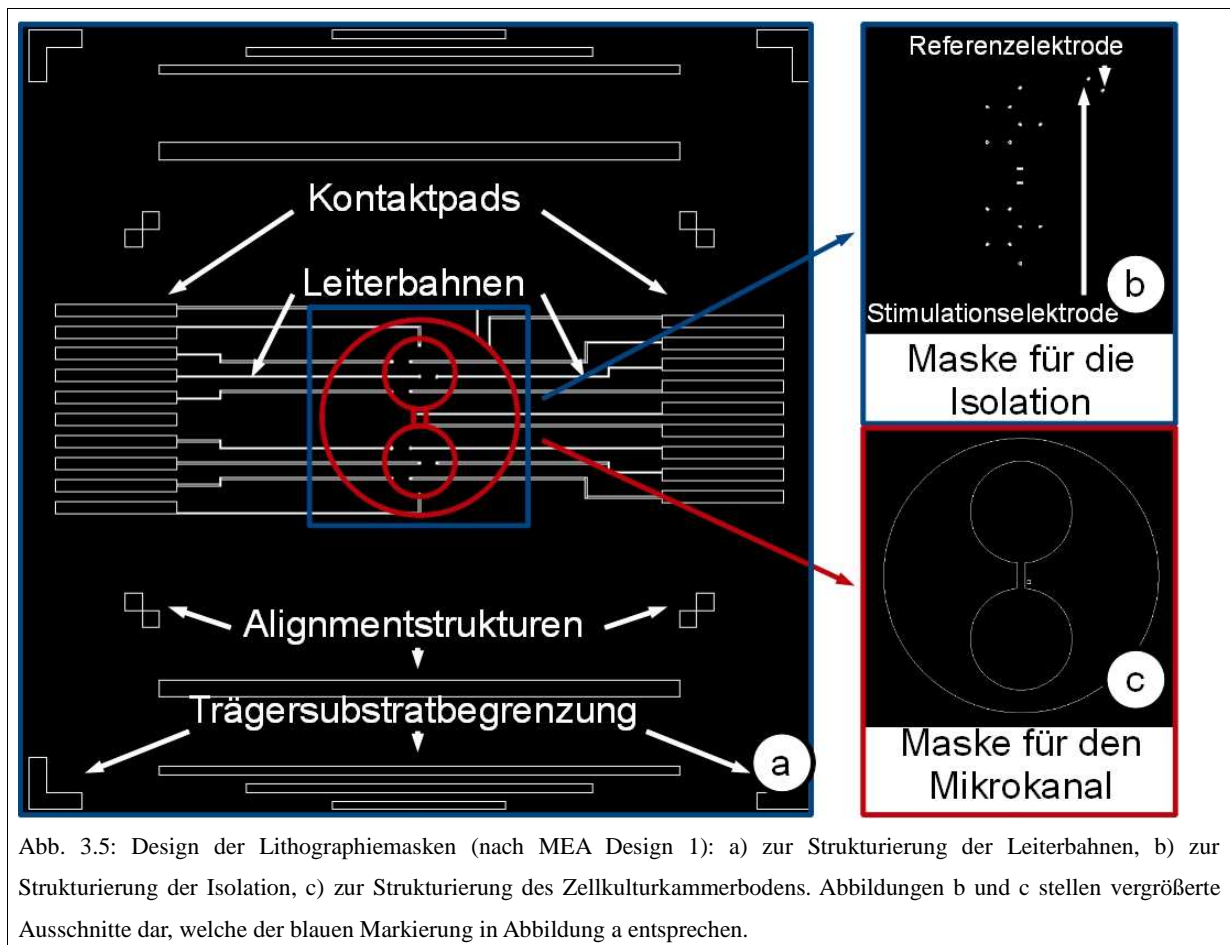
Tab. 3.2: Zur Zellkultivierung von Neuronen eingesetzte Lösungen und korrekte Dosierung [21]

3.2 Biochippprozessierung

Die Herstellung der Mikroelektrodenarrays (MEAs) beginnt bei der Produktion der Lithographiemasken. Die gewünschten Lithographiemasken wurden mit Autocad 2008 entworfen (siehe Kap. 3.2.1). Anschließend wurde mit einem Heidelberg Laserschreiber in einem Fotolack auf einer Multischicht aus verschiedensten Metallen auf dem Maskenträger die Struktur der entworfenen Lithographiemaske belichtet und entwickelt. Die hergestellten Lithographiemasken wurden im weiteren in einem Ablauf unterschiedlicher Beschichtungsverfahren (siehe Kap. 3.2.2) zur Strukturierung von MEAs eingesetzt. Dazu soll auf die Haftung der einzelnen Materialschichten eingegangen werden (siehe Kap. 3.2.3). Damit später Zellen in einem Nährmedium auf dem MEA kultiviert werden können, wurde außerdem eine Zellkulturkammer hergestellt (siehe Kap. 3.2.4) und auf dem MEA aufgebracht. Die eingesetzten Geräte und Prozessparameter sind in Kap. 3.2.5 zusammengefasst.

3.2.1 MEA-Dimensionierung

Das Design der MEAs orientierte sich an der Zielsetzung, Signale von Zellen innerhalb einer von einem strukturierten Zellkulturkammerboden definierten Fläche ableiten zu können. Es wurden zwei Designs ausgearbeitet. Das erste Design orientierte sich stark nach einer zuverlässigen technischen Umsetzbarkeit. Deshalb sind die Leiterbahnen auf der entsprechenden Lithographiemaske und die Ätzlöcher für die Elektroden auf der Lithographiemaske zur Strukturierung der Isolationsschicht relativ groß (100 µm Durchmesser; siehe Abb. 3.5 und 3.6).



Da große Elektroden nur starke Spannungsschwankungen messen können, wobei an den gemessenen Spannungsunterschieden auch die Signale von mehreren Neuronen beteiligt sein können, ist dieses MEA gut geeignet für die Ableitung von **Bursts** (Signalausbreitung im gesamten Neuronennetzwerk). Zu diesem Zweck sind die Elektroden in einem großen Abstand (1 mm von Mittelpunkt zu Mittelpunkt) angeordnet. Für die Kontaktierung der Elektroden sind die **Kontaktpads** (Kontaktflächen) zu beiden Seiten (Links / rechts für getrennte Messung / Stimulation) vorgesehen, und richten sich in ihrem Abstand nach dem Rastermaß des Vorverstärkers. Die Trägersubstratbegrenzung auf den Lithographiemasken erleichtert die Orientierung beim Einlegen der Masken in den Mask-Aligner. Die Alignmentstrukturen sollen ein präzises **Alignment** (Positionierung einer Lithographiemaske über einem bereits strukturierten Substrat) erlauben.

Auf der Lithographiemaske zur Strukturierung des Mikrokanals ist die gewünschte Beschaffenheit des Zellkulturkammerbodens zu sehen: zwei runde Vertiefungen, die durch einen dünnen Kanal (300 μm) verbunden werden. Als Referenzelektrode sollte eine außerhalb der Vertiefungen, aber noch im Elektrolyt gelegene Elektrode eingesetzt werden. Für den Fall, dass diese Referenzelektrode aufgrund ihres kleinen Durchmessers störenden Spannungsschwankungen unterlegen ist (siehe Kap. 2.2.2), befindet sich 1 mm daneben eine Stimulationselektrode.

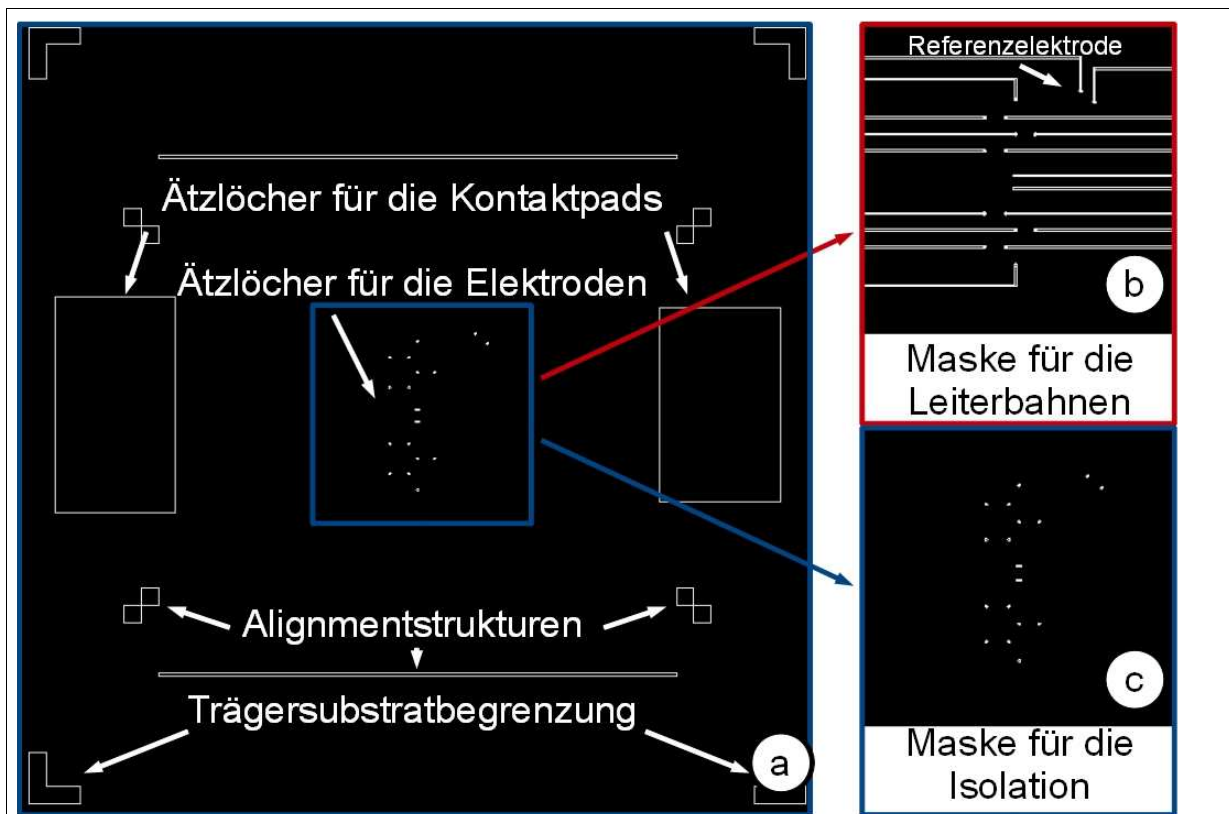


Abb. 3.6: Design der Lithographiemasken (nach MEA Design 1): a) zur Strukturierung der Isolation, b) zur Strukturierung der Leiterbahnen, c) zur Strukturierung des Isolation. Abbildungen b und c stellen vergrößerte Ausschnitte dar, welche der blauen Markierung in Abbildung a entsprechen.

Das zweite MEA-Design wurde geplant, um den Einfluss von Elektrodenoberfläche und Elektrodenabstand zu bestimmen. Auf jeder Seite wurde deshalb ein Array von Elektroden mit einem anderen Durchmesser (10/30/50/100 μm) im verhältnismäßig etwa gleichen Abstand (100/200/350/700 μm) aufgebracht (siehe Abb. 3.7). Dabei wurde angenommen, dass jede Elektrode sowohl als Mess- wie auch als Stimulationselektrode genutzt werden kann. Die Referenzelektrode befindet sich hier in der Mitte, um möglichst nahe an den Messelektroden zu sein. Sie ist um einiges größer ($a = 2,5 \text{ mm}$), damit ein stabiles Elektrodenpotential gewährleistet ist, und auf allen Seiten mit einem Kontaktpad verbunden. Des Weiteren wurde zur Schirmung eine Leiterschleife um das ganze MEA vorgesehen, die ebenfalls auf allen Seiten mit einem Kontaktpad verbunden ist. Die Kontaktflächen an den Ecken sollen die Möglichkeit bieten, diese Leiterschleife mit der Referenzelektrode zu verbinden. Der Abstand der Kontaktpads richtet sich wiederum nach dem Rastermaß der Kontaktstifte des Vorverstärkers. Die gefertigten Lithographiemasken werden in einem Ablauf von mehreren Beschichtungsverfahren zur Strukturierung verwendet.

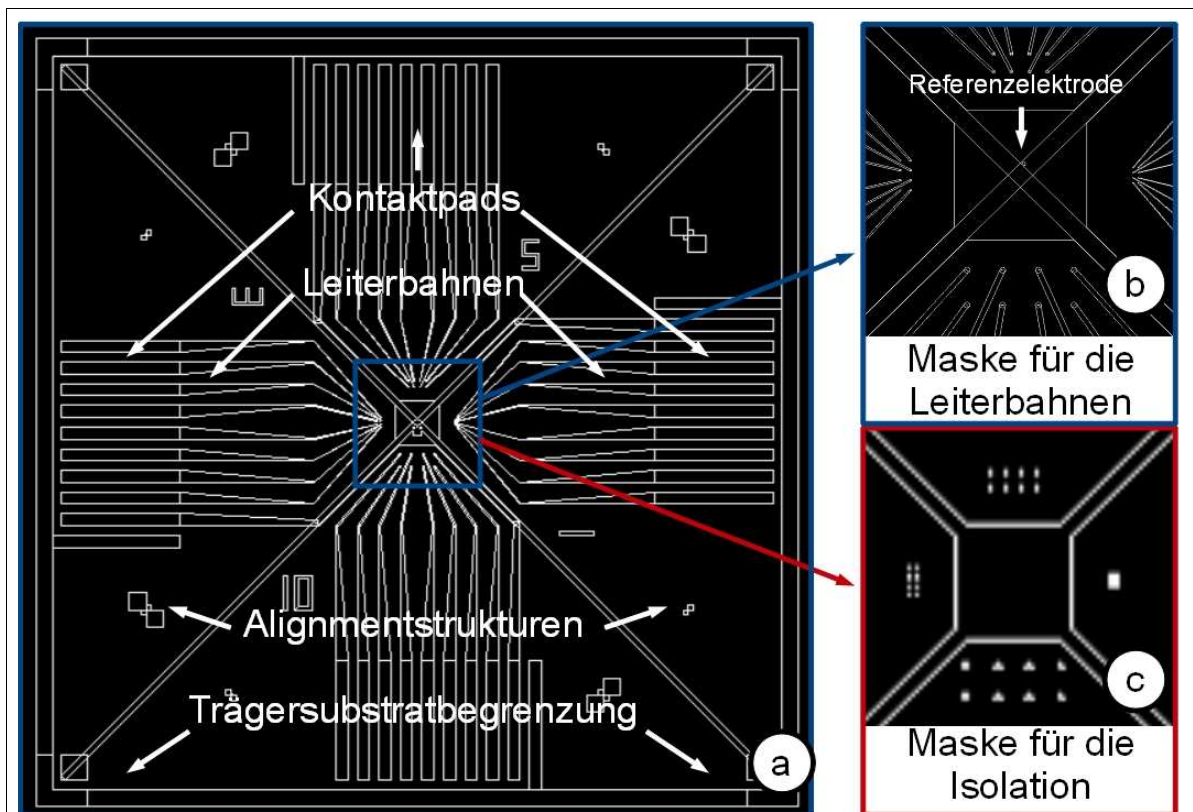


Abb. 3.7: Design der Lithographiemasken (nach MEA Design 2): a) zur Strukturierung der Leiterbahnen, b) zur Strukturierung der Isolation, c) zur Strukturierung des Zellkulturkammerbodens. Abbildungen b und c stellen vergrößerte Ausschnitte dar, welche der blauen Markierung in Abbildung a entsprechen.

3.2.2 Schematischer Prozessablauf

Die Prozessierung der Biochips läuft in 15 Prozessschritten ab, in denen das Trägersubstrat beschichtet oder eine bestehende Schicht wieder vom Trägersubstrat entfernt wird. Nach sämtlichen Bearbeitungsschritten bleiben die Leiterbahnen mit eventuell nötiger Haftschrift (Schritte a – h), die Isolation mit freigelegten Elektroden und Kontaktpads (Schritte i – k), die Oberflächenvergütung an den Elektroden (Schritte l – m) und die Zellkulturkammer (Schritte n – o) auf dem Trägersubstrat bestehen (siehe Abb. 3.8). Das neurobasale Nährmedium, das später in die Zellkulturkammer eingefüllt werden soll, wird durch die Isolation elektrisch von den Leiterbahnen getrennt, sodass diese Signale von den Elektroden zu den Kontaktpads ableiten. Die Oberflächenvergütung an den Elektroden soll dabei den Kontakt zum Neuron verbessern. Dazu bedarf es der in Kap. 2.3.1 beschriebenen lithographischen Strukturierung in Kombination mit in Kap. 2.3.2 beschriebenen plasmaunterstützten Beschichtungsverfahren und Ätzprozessen. Zur genaueren Übersicht ist der gesamte Fertigungsablauf in Tabelle 3.3 dargestellt.

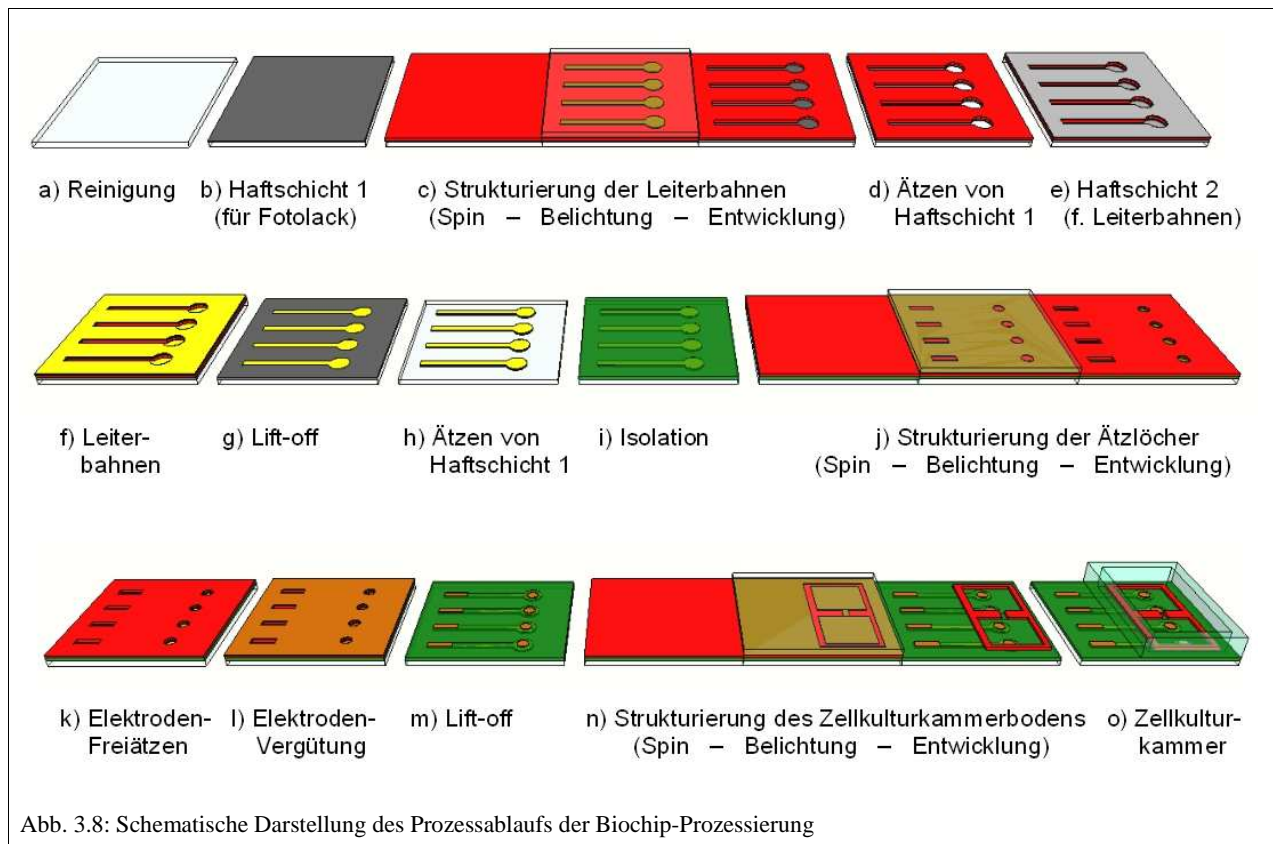


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des Prozessablaufs der Biochip-Prozessierung

- Die Leiterbahnen werden im Lift-off-Verfahren strukturiert. Dazu wird das Trägersubstrat nach der Reinigung (Schritt a) eine Fotolackschicht aufgebracht und lithographisch strukturiert (Schritt c), welche nach gleichmäßigem Beschichten mit Leitermaterial mittels Sputtern (Schritt f) wieder entfernt wird (Schritt g). Dabei wird das über dem strukturierten Fotolack liegende Leitermaterial ebenfalls entfernt. Das bestehende Leitermaterial bildet die Leiterbahnen. Um die Haftung des Fotolacks wie des Leitermaterials auf dem Trägersubstrat zu verbessern, kann das Trägersubstrat zusätzlich mit einem Haftvermittler beschichtet werden, welche eventuell auch wieder entfernt werden. Entsprechende Prozessschritte (Schritte b, d, e, h) sind somit als optional (aber durchaus hilfreich) anzusehen und werden im folgenden Kapitel eingehender erläutert.

- Die Isolation wird durch reaktives Ionenätzen strukturiert. Dazu wird nach der Beschichtung mit dem Isolationsmaterial mittels PECVD (Schritt i) eine Fotolackschicht aufgebracht und lithographisch strukturiert (Schritt j), welche im Ätzprozess (Schritt k) die nicht zu ätzenden Bereiche bedeckt. So kann die Isolation gezielt nur an den für die Kontaktpads und die Elektroden vorgesehenen Bereichen von den Leiterbahnen entfernt werden.
- Die Oberflächenvergütung an den Elektroden wird wiederum im Lift-off-Verfahren strukturiert. Dabei wird die bereits bestehenden Lackschicht mittels Sputtern mit dem Vergütungsmaterial beschichtet (Schritt l) und anschließend die Lackschicht entfernt (Schritt m). So kann die Vergütung gezielt auf die Elektroden aufgebracht werden.
- Der Zellkulturkammerboden wird direkt lithographisch strukturiert (Schritt n). Er besteht aus einem biokompatiblen und im ausgehärteten Zustand besonders stabilen Fotolack. Die Wände der Zellkulturkammer wurden in einem eigenen Verfahren hergestellt, welches noch eingehender beleuchtet werden soll (siehe Kap. 3.2.4). Das Anhaften der Wände auf der Oberfläche des MEAs (Schritt o) kann durch vorhergehendes Plasmaveraschen zur Hydrophilisierung der beiden Kontaktflächen erheblich verbessert werden.

Der Prozessablauf in einzelnen Prozessschritten			
	Prozessschritt	Methode	Material
Leiterbahnen	a) Reinigung des Trägersubstrats	Ultraschallbad	Aceton / Propanol
	b) Beschichtung mit der Haftschrift 1 für den Fotolack	Sputtern / PECVD	Cr / Si ₃ N ₄
	c) Beschichtung mit Fotolack und Strukturierung der Leiterbahnen	Lithographie	Fotolack
	d) Entfernung der Haftschrift 1 an freien Stellen	Nass-chemisches Ätzen	Cr-Ätze
	e) Beschichtung mit Haftschrift 2 für das Leitermaterial	Sputtern	Ti / Cr
	f) Beschichtung mit Leitermaterial	Sputtern	Au / Pt
	g) Entfernung des Fotolacks (und Material darüber)	Lift-off	Aceton
	h) Entfernung der restlichen Haftschrift 1	Nass-chemisches Ätzen	Cr-Ätze
Isolation	i) Beschichtung mit der Isolationsschicht	PECVD	Si ₃ N ₄
	j) Beschichtung mit Fotolack und Strukturierung der Ätzlöcher	Lithographie	Fotolack
	k) Freiätzen der Elektroden und Kontaktpads	RIE	SF ₆
Vergütg.	l) Beschichtung mit der Elektrodenvergütung	Sputtern	TiN
	m) Entfernung des Fotolacks (und Material darüber)	Lift-off	Aceton
Kammer	n) Beschichtung mit Fotolack und Strukturierung des funktionalisierten Zellkulturkammerbodens	Lithographie	SU-8 Fotolack
	o) Anhaften der Zellkulturkammer	Plasmaveraschen	O ₂ -Plasma

Tab. 3.3: Übersicht über die Prozessschritte zur Biochip-Prozessierung und die benötigten Prozesse

3.2.3 Haftung der Materialien

Der Fotolack haftet haften zwar nicht ausreichend auf dem verwendeten Trägersubstrat, jedoch gut auf Chrom wie auch auf Siliziumnitrid. Da beide Materialien auch gut auf dem Trägersubstrat haften, bieten sie sich als Haftschrift zwischen Lack und Trägersubstrat an (Schritt b) an. Wird mit Siliziumnitrid als Haftschrift gearbeitet, muss diese nicht mehr entfernt werden, da sie transparent ist und nicht elektrisch leitet. Dadurch entfallen die Schritte d und h. Das Nass-chemische Ätzen ist nur für Chromoberflächen anzuwenden.

Reine Edelmetalle wie Gold oder Platin als Leiterbahnen (Schritt f) haften nicht ausreichend gut auf Glassubstraten. Als zusätzliche Haftschrift muss deshalb zwischen Glas und Edelmetall eine dünne Schicht Chrom oder Titan aufgebracht werden. Wird als Haftschrift für den Fotolack und als Haftschrift für die Leiterbahnen das gleiche Material (Chrom) eingesetzt, entfällt der erste Chromätzschritt (Schritt d) sowie das sputtern der Haftschrift für die Leiterbahnen (Schritt e). Beim Beschichten mit einem Metall, das selbst auf dem Trägersubstrat haftet, entfällt die Notwendigkeit für eine zusätzliche Haftschrift (Schritt e).

Die Oberflächenvergütung der Elektroden und Kontaktpads (Schritt l) durch eine zusätzliche Schicht von Titanitrid zur Verbesserung der Zelladhäsion ist optional und wurde nicht auf alle MEAs angewendet. Es muss jedoch vorausgesetzt werden, dass die Oberflächenvergütung auf dem Leitermaterial haftet. [22]

Die Beschichtung mit SU8-Lack zur Funktionalisierung des Zellkulturkammerbodens (Schritt n) wurde nur am ersten MEA-Design angewandt. Die ausreichende Haftung des Lacks wurde in Vorversuchen bestätigt.

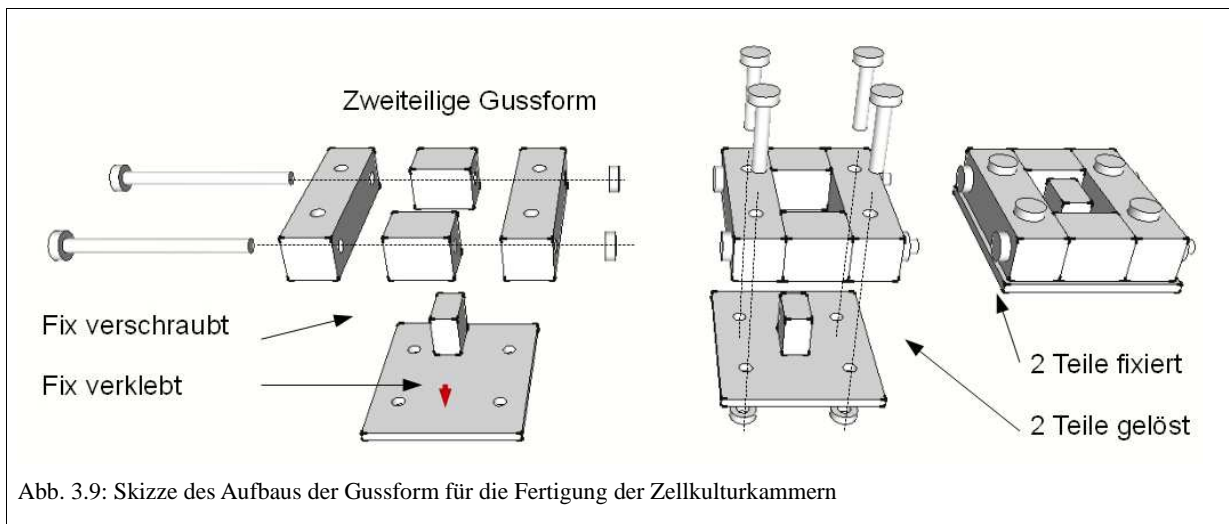
Die Zellkulturkammer besteht aus einem Silikonkautschuk. Das permanente Anhaften auf dem MEA kann durch vorhergehende Hydrophilisierung der beiden Kontaktflächen erreicht werden [23].

Die Fertigung der Zellkulturkammer ist eine erstmalige Aufgabe dieser Arbeit. Die Herstellungsparameter für die Schritte der Oberflächenvergütung (Schritt l), der Beschichtung und Strukturierung eines Fotolacks als Zellkulturkammerboden (Schritt n) und das Anhaften der Zellkulturkammerwände auf dem MEA (o) mussten zuerst gefunden werden. Die Herstellung der Zellkulturkammerwände wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

3.2.4 Fertigung der Zellkulturkammern

Auf den fertigen MEAs Zellkulturkammern befestigt, um darin das neurobasale Nährmedium aufnehmen zu können. Die Zellkulturkammern mussten jedoch zuerst gefertigt werden. Wegen seiner guten Haftung auf Glas wurde hierfür als Werkstoff ein biokompatibler Silikonkautschuk gewählt. Dieser liegt zunächst im flüssigen Zustand vor, sodass er durch Gussformen strukturiert werden kann.

Durch Sägen, Fräsen, Bohren, Verschrauben und Verkleben wurden zwei verschiedene Gussformen aus Aluminium angefertigt. Damit sich die Gussformen von den Zellkulturkammern lösen lassen, sind sie aus jeweils zwei Teilen zusammengesetzt, aus der Bodenplatte und den Wänden der Gussform (siehe Abb. 3.9). Mit jeder Gussform lässt sich eine oben und unten offene Zellkulturkammer oder (nach Wenden der Bodenplatte) ein passender Deckel fertigen. Die Bodenplatten wurden zu diesem Zweck glatt geschliffen, da die Zellkulturkammern später wasserdicht auf dem ebenfalls glatten Substrat haften sollen.



Der eingesetzte Silikonkautschuk (siehe Abb. 3.10 [24]) besteht aus zwei Komponenten (Elastomer und Katalysator), welche vor dem Gießen vermengt werden. Dabei entstehen jedoch etliche kleiner Luftblasen, welche in einer Vakuumkammer zum Anwachsen, Aufsteigen und Zerplatzen gebracht werden können. Danach wird der Silikonkautschuk vorsichtig in die Form gegossen und im Ofen bei 110°C hart gebacken. Werden nach anschließender Abkühlung Bodenplatte und Wände der Gussform getrennt, lässt sich die Zellkulturkammer leicht herauslösen. Tabelle 3.4 zeigt die verwendeten Herstellparameter für das Vergießen des Silikonkautschuks [24].



Fertigung einer Zellkulturkammer aus Silikonkautschuk	
<u>Silikonkautschuk</u>	Sylgard DC 184 silicone elastomer
Mischen	1 zu 10 (Katalysator/Elastomer), langsam
Vakuumpumpe	Pfeiffer vacuum duo 5
Luftblasen entfernen	4 mal bis 100 mbar und wieder belüften
Gießen	Langsam und gleichmäßig an gleicher Stelle
Backen	45 Min.bei 110°C

Tab. 3.4: Angewandte Prozessparameter bei der Fertigung der Zellkulturkammer

3.2.5 Geräte und Parameter im Prozessablauf

Im folgenden Kapitel werden die im Prozessablauf zur Herstellung der Biochips verwendeten Geräte und damit durchgeführten Prozesse näher beschrieben.

Reinigung (Prozessschritt a)

Die Reinigung des Trägersubstrats im Ultraschallbad (siehe Abb. 3.11) ist ein wesentlicher Schritt, da jedweder Schmutz zu erheblichen Haftungsproblemen führen kann. Nicht umsonst werden die MEAs ausschließlich im Reinraum gefertigt. Wird das Trägersubstrat während des Prozessablaufs verunreinigt, dann wurde auf diesen Schritt zurückgegriffen. Tabelle 3.5 zeigt die verwendeten Parameter für den Reinigungsprozess.

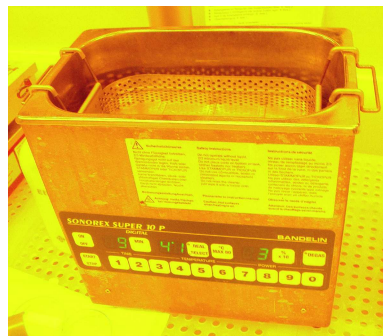


Abb. 3.11: Ultraschallreiniger (Foto)

Reinigung des Trägersubstrats		
<u>Ultraschallreiniger:</u>		SONOREX Digital 10P Bandelin
<u>Trägersubstrat:</u>		BOROFLOAT 33 Borosilicatglas
1. Reinigung in separatem Becherglas	<u>Lösungsmittel</u>	Aceton
	Leistung	100 Watt
	Zeit	3 – 4 Min.
2. Reinigung in separatem Becherglas	<u>Lösungsmittel</u>	Isopropanol
	Leistung	100 Watt
	Zeit	3 – 4 Min.
Trocknen		Stickstoff

Tab. 3.5: Angewandte Prozessparameter bei der Reinigung des Trägersubstrats

Sputtern (Prozessschritte b, e, f, l)

In der Sputteranlage (siehe Abb. 3.12) wird das Trägersubstrat mit Haftmaterial (Cr, Ti), Leitermaterial und Oberflächenvergütung (TiN) beschichtet. Die Werte für die resultierenden Schichtdicken beziehen sich auf bestehende Tabellen ausgewerteter vorangehender Arbeiten. Da die Prozessparameter für die Oberflächenvergütung aus Titanitrid erst bestimmt werden mussten, wurden diese variiert. Tabelle 3.6 zeigt die gefundenen Parameter.

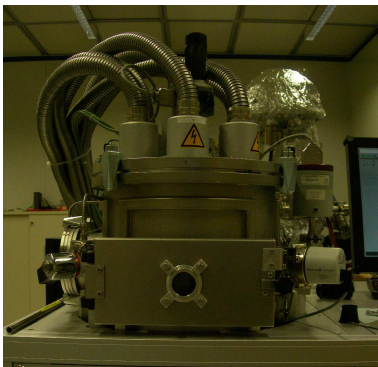


Abb. 3.12: Sputteranlage (Foto)

Prozessparameter beim Sputtern							
<u>Modell:</u>	Von Ardenne LS 320 S						
Targetmaterial:	Cr	Ti	Au	Pt	Ni	Ge	TiN
Basisdruck [mbar]	<3e ⁻⁵						
Arbeitsdruck [mbar]	8e ⁻³						Var.
HF-Leistung [W]	100	100	50	100	100	100	50
Sputterdauer [s]	30	2x50	3x50	60	60	60	Var.
Vorsputtern [s]	30	2x50	3x50	60	60	60	10x60
Schichtdicke [nm]	25	60	240	120	o.A.	o.A.	Var.

Tab. 3.6: Angewandte Prozessparameter beim Sputtern und nominelle Schichtdicken

Fotolithographie (Prozessschritte c, j)

Durch die Lithographie wird das Trägersubstrat mit Hilfe eines Spin-Coaters (siehe Abb. 3.13) gleichmäßig mit Fotolack beschichtet und diese schützende Lackschicht durch Belichtung in einem Mask-Aligner (siehe Abb. 3.14) den Mikrostrukturen auf den verwendeten Lithographiemasken entsprechend strukturiert. In einem letzten Schritt (Strippen oder Lift-off) kann der Fotolack wieder gelöst werden. Die Dauer der Strukturbelichtung bei der Lithographie wurde daran angepasst, ob die Haftsicht für den Fotolack durchsichtig ist oder reflektiert. Besondere Sorgfalt wurde beim Abspülen des Entwicklers angewandt, damit keine Lackreste an der Lackstruktur hängen bleiben. Tabelle 3.7 zeigt die verwendeten Parameter.

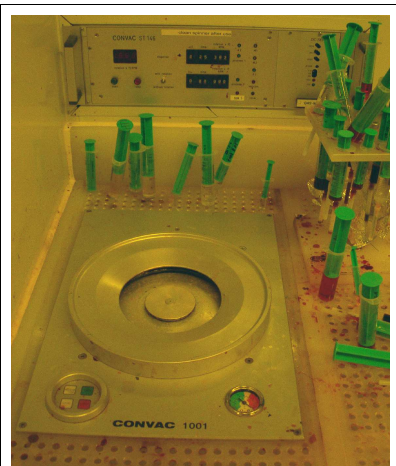


Abb. 3.13: Spin-Coater (Foto)

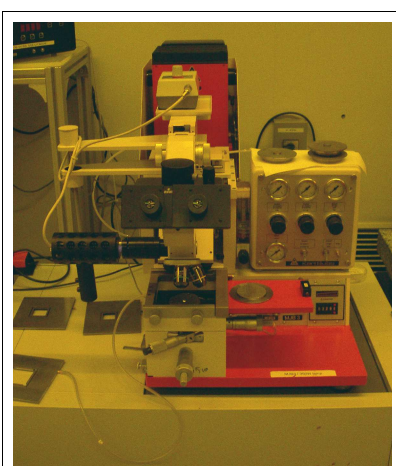


Abb. 3.14: Mask-Aligner (Foto)

Prozessparameter bei der lithographischen Strukturierung				
<u>Lack</u>	AZ 5214 (1:0) Image Reversal			
<u>Spin-Coater</u>	Convac 1001 / Fairchild 1001			
Dispense	10 s bei 300 rpm (Rampe: 64)			
Spin	30 s bei 3000 rpm			
Heizplatte	Präzitherm PZ 28-2			
Prozess	Umkehrprozess		Positivprozess	
Softbake	60 s bei 100°C		60 s bei 100 °C	
<u>Mask-Aligner</u>	Karl SUSS MJB3			
Wellenlänge	365 nm			
Energiedichte	~ 50 mW/cm²			
<u>Lithographiemaske</u>	Für die Leiterbahnen		Für die Isolation	
Haftschicht	Transp.	Reflekt.	Transp.	Reflekt.
Belichtungsdauer	3,5 s	3,2 s	3,5 s	3,2 s
Flutbelichtungsdauer	13,5 s	13,2 s	-	-
Hardbake	60 s bei 110 °C			
<u>Entwickler</u>	AZ 726 MIF			
Entwicklungsdauer	70 s	90 s	70 s	90 s
Spülen	Deionisiertes Wasser, fließend!			
<u>Stopper</u>	Deionisiertes Wasser im Becherglas			
Trocknen	Stickstoff			

Tab. 3.7: Angewandte Prozessparameter in der Lithographie

Nasschemisches Ätzen von Chrom (Prozessschritte d, h)

Wegen der schlechten Haftung des Fotolacks auf dem Trägersubstrat wurde eine Chromschicht als Haftvermittler aufgetragen. Da Chrom elektrisch leitet, muss diese Schicht in zwei separaten Prozessschritten wieder entfernt werden, einmal vor der Beschichtung mit Leitermaterial, einmal nach der Entfernung des Fotolacks. Durch Nasschemisches Ätzen mit einer Chromätze (siehe Abb. 3.15) wird unbedecktes Chrom vom Trägersubstrat gelöst. Dies geht recht schnell und der Ätzfortschritt kann leicht optisch wahrgenommen werden. Deshalb wurde die Zeit im Lösungsbad nur geschätzt. Tabelle 3.8 zeigt die verwendeten Parameter.



Abb. 3.15: Chrom-ätze (Foto)

Prozessparameter beim Nasschemischen Ätzen	
<u>Lösungsmittel</u>	Microposit Chrome Etch 18
Lösungsdauer	25 – 35 s
<u>Stopper</u>	Spülen in fließendem Wasser / deionisiertes Wasser im Becherglas
Trocknen	Stickstoff

Tab. 3.8: Angewandte Prozessparameter beim nasschemischen Ätzen von Chrom

Lift-off (Prozessschritte g, m)

Im Lift-off-Verfahren werden metallische Mikrostrukturen hergestellt. Dazu wird eine Lackschicht mit Fotolithographie strukturiert und darüber eine Metallschicht abgeschieden. Anschließend wird die strukturierte Lackschicht mit dem darauf abgeschiedenen Metall gelöst. Wesentlich ist, dass das Lösungsmittel auch horizontal durch die Lackschicht diffundiert, also mit der Zeit der komplette Fotolack gelöst wird. Dabei werden natürlich alle den Fotolack bedeckenden Flächen der darüber liegenden Leiterschicht ebenfalls vom Trägersubstrat gelöst. Die Zeit, die der Lift-off benötigt, hängt stark von der größten geschlossenen Fläche ab, die der Fotolack bedeckt. Der Fortschritt des Lösungsmittels wurde optisch mitverfolgt und durch punktuelles Einspritzen des Lösungsmittels unterstützt. Die mit Lösungsmittel gefüllten Bechergläser wurden während der Entfernung des Fotolacks mehrmals gewechselt (siehe Abb. 3.16), da bereits im Lösungsmittel gelöste Metallreste die Mikrostrukturen auf dem Trägersubstrat beschädigen können. Tabelle 3.9 zeigt die verwendeten Parameter.



Abb. 3.16: Zum Lift-off nötige Bechergläser (Foto)

Prozessparameter beim Lift-off		
Metall-Lift-off in separatem Becherglas	<u>Lösungsmittel</u>	Aceton
	Dauer	~ 10 Min.
	Spülen:	Aceton
<u>Ultraschallreiniger:</u>		SONOREX Digital 10P Bandelin
1. Reinigungsschritt in separatem Becherglas	<u>Lösungsmittel</u>	Aceton
	Leistung	100 Watt
	Dauer	2 – 3 Min.
	Spülen:	Isopropanol
2. Reinigungsschritt in separatem Becherglas	<u>Lösungsmittel</u>	Isopropanol
	Leistung	100 Watt
	Dauer	2 – 3 Min.
Trocknen		Stickstoff

Tab. 3.9: Angewandte Prozessparameter im Lift-off-Prozess

PECVD (Prozessschritt i)

Gemäß des Prozessplanes (siehe Abb. 3.8) werden Leiterbahnen mit Isolationsmaterial bedeckt, damit sie später vom neurobasalen Nährmedium getrennt sind. Im PECVD-Verfahren wird das Trägersubstrat in einer speziellen Anlage (siehe Abb. 3.17) mit Isolationsmaterial beschichtet. Die Werte für die resultierenden Schichtdicken beziehen sich auf bestehende Tabellen ausgewerteter vorangehender Arbeiten. Tabelle 3.10 zeigt die verwendeten Parameter für den PECVD-Prozess.

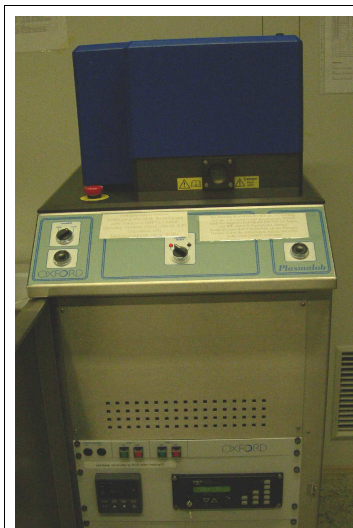


Abb. 3.17: PECVD-Anlage (Foto)

Prozessparameter bei der PECVD		
<u>Modell</u>	Oxford Plasmalab 80 Plus	
Abgeschiedenes Material	Siliziumnitrid	Siliziumoxid
Basisdruck [Torr]	0,06	0,06
Arbeitsdruck [Torr]	1	1
Trägersubstrat-Temperatur [°C]	300	300
HF-Leistung [W]	10	10
<u>Einströmgeschwindigkeiten</u>		
2%iges SiH ₄ [sccm]	700	425
NH ₃ [sccm]	18	----
N ₂ O [sccm]	----	710
Dauer	10/30 Min.	12 Min.
Nominelle Schichtdicke [nm]	120/360 nm	480

Tab. 3.10: Angewandte Prozessparameter bei der PECVD

RIE (Prozessschritt k)

Um das auf den Leiterbahnen aufgetragene Isolationsmaterial an den Mikroelektroden und auf den Kontaktpads im RIE-Verfahren selektiv wieder zu entfernen, wird zunächst eine Fotolackschicht auf dem Isolationsmaterial aufgetragen und lithographisch strukturiert. In einer speziellen Anlage (siehe Abb. 3.18) wird die gesamte Oberfläche geätzt, wobei der Fotolack nicht mit dem Reaktionsgas reagiert und so auch darunter liegendes Isolationsmaterial schützt. Somit werden nur die nicht mit Fotolack bedeckten Flächen der der Isolation selektiv entfernt. Tabelle 3.11 zeigt die verwendeten Parameter für das Freiätzen der Elektroden und Kontaktpads. Die Ätzrate bezieht sich auf bestehende Tabellen ausgewerteter vorangehender Arbeiten.

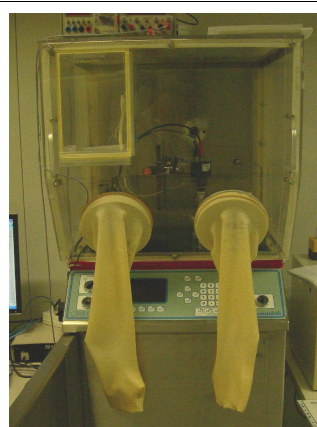


Abb. 3.18: RIE-Anlage (Foto)

Prozessparameter beim reaktiven Ionenätzen	
<u>Modell</u>	Oxford Plasmalab 80 Plus
Basisdruck [mbar]	5×10^{-5}
Arbeitsdruck [mTorr]	50
Leistung [W]	50
<u>Einströmgeschwindigkeiten</u>	
Arbeitsgas (Ar) [sccm]	10
Reaktionsgas (SF ₆) [sccm]	20
Dauer [Min.]	12
Nominelle Ätzrate Siliziumnitrid	30 nm/Min.

Tab. 3.11: Angewandte Prozessparameter beim reaktiven Ionenätzen

Lithographische Strukturierung des Zellkulturkammerbodens (Prozessschritt n)

Es wurden Zellkulturkammern mit Kanalstrukturen über Elektroden entwickelt. Diese Kanalstrukturen wurden mittels eines Fotolacks, der Schichtdicken von bis zu 300 µm zulässt, hergestellt. Dieser Lithographieschritt wurde mit einem SU-8 Fotolack auf Epoxidbasis (siehe Abb. 3.19) durchgeführt. Der eingesetzte Negativresist ist bekanntermaßen biokompatibel [25] und im ausgehärteten Zustand nicht mehr durch herkömmliche Lösungsmittel abzulösen. Dazu wird der SU-8 Fotolack nach der Entwicklung auf einer Heizplatte (siehe Abb. 3.20) hart gebacken.

Er bleibt danach bestehen und wird nicht durch erneuten Lift-off entfernt. So wird der Zellkulturkammerboden direkt durch das Lackmaterial selbst lithographisch strukturiert. Dieser Fotolack ist hochviskos sodass mit angepassten Prozessparametern eine Schichtdicke von über 300µm erreicht werden kann. Für die lithographische Strukturierung dieses SU-8 Lacks sind jedoch andere Prozessparameter notwendig, sodass ausgehend von Standardparametern [26] Parameter optimiert wurden. Weil der Fotolack so hochviskos ist, muss er zunächst grob verteilt (engl. **Dispense**) an anschließend durch schnellere Rotation (Spin) auf gewünschte gleichmäßige Schichtdicke gebracht werden. Tabelle 3.12 zeigt die verwendeten Parameter für die Lithographie von SU-8 Fotolack.



Abb. 3.19: Fotolack SU-8 2150 (Foto)



Abb. 3.20: Heizplatte (Foto)

Strukturierung des Zellkulturkammerbodens	
<u>Lack</u>	SU-8 2150 (1:0)
<u>Spin Coater</u>	Convac 1001 / Fairchild 1001
Dispense	100 – 200 s bei 500 rpm
Spin	100 – 1000 s bei 3000 rpm
Heizplatte	Präzitherm PZ 28-2
Softbake	30 Min. bei 95 °C
<u>Mask-Aligner</u>	Karl SUSS MJB3
<u>Lithographiemaske</u>	Zur Strukturierung des Kammerbodens
Belichtungsdauer	8 – 9 s
Hardbake	15 Min. bei 95 °C
<u>Entwickler</u>	mr-Dev 600
Entwicklungsdauer	20 Min.
<u>Stopper</u>	Isopropanol im Becherglas
Spülen	Deionisiertes Wasser, fließend!
Trocknen	Stickstoff

Tab. 3.12: Angewandte Prozessparameter bei der lithographischen Strukturierung

Befestigung der Zellkulturkammer (Prozessschritt o)

Um eine wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben aus Silikonkautschuk hergestellte Zellkulturkammer auf dem Trägersubstrat zu befestigen, wird sie zusammen mit diesem mit den gewünschten Kontaktflächen nach oben in den Plasmaverascher (Siehe Abb. 3.21) eingeschleust. Mit Hilfe eines Sauerstoffplasmas werden die Oberflächen hydrophilisiert, um so besser aneinander zu haften. Anschließend werden sie in gewünschter Position aufeinander gepresst und unter diesem Anpressdruck zum Aushärten der neuen Verbindungen zwischen Trägerglas und Silikonkautschuk im Ofen gebacken. Die Prozessparameter mussten erst bestimmt werden, wobei als Orientierungshilfe auf bereits veröffentlichte Arbeiten zu diesem Thema zurückgegriffen wurde [23]. Tabelle 3.13 zeigt die verwendeten Parameter des Plasmaveraschens.



Abb. 3.21: Plasmaverascher (Foto)

Prozessparameter beim Plasmaveraschen	
<u>Plasmaverascher</u>	TEPLA 300-E
Prozessgas	>99,99% Sauerstoff
Prozessdruck	0,7 Torr
Leistung	100 W
Veraschungsdauer	3 s
Backen	30 Min. bei 100 °C

Tab. 3.13: Angewandte Prozessparameter bei der Hydrophilisierung der Zellkulturkammer im Plasmaverascher zur Haftungssteigerung

Mit den beschriebenen Prozessen konnte eine vollständige Fertigung der Biochips durchgeführt werden. Für die elektrische Signalableitung mussten die Biochips in eine Kontakthalterung für die Messelektronik eingesetzt werden.

3.3 Kontaktierung der Biochips

Zur elektrischen Kontaktierung der Messelektronik mit dem Biochip in einer Kontakthalterung (siehe Kap. 3.3.2) wurde ein Kontaktkonzept (siehe Kap. 3.3.1) entwickelt, das ermöglichen soll, vom Biochip abgeleitete Signale ohne weitere Leitungswege direkt zu verstärken, um den Einfluss von Störsignalen aus der Umgebung zu reduzieren.

3.3.1 Kontaktkonzept

Um mit den prozessierten Biochips neuronale Aktivität ableiten zu können, muss zunächst der elektrische Kontakt von Biochip zu Messinstrument gewährleistet sein. Dies soll über Feinrasterstifte (siehe Abb. 3.22 [27]) geschehen, die in die Eingänge dreier übereinander gestapelter Buchsenleisten gesteckt werden.

Damit später der Vorverstärker (siehe Abb. 3.23, [28]) direkt angeschlossen werden kann, wurde der Durchmesser der Feinrasterstifte und damit auch das Rastermaß der Buchsenleisten an das Rastermaß des Vorverstärkers angepasst (siehe Kap. 3.2.1).

Die Buchsenleisten wurden anschließend in eine gefräste Führung in einem L-Profil geklemmt, welches zur Justiermöglichkeit an einem Translationstisch [29] befestigt wird (siehe Abb. 3.24).



Abb. 3.23: Vorverstärker mit Anschlüssen [28]

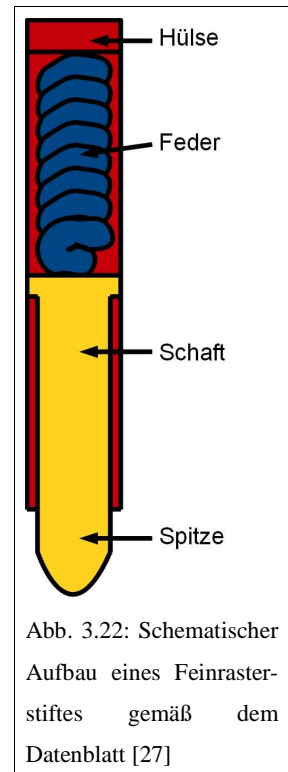
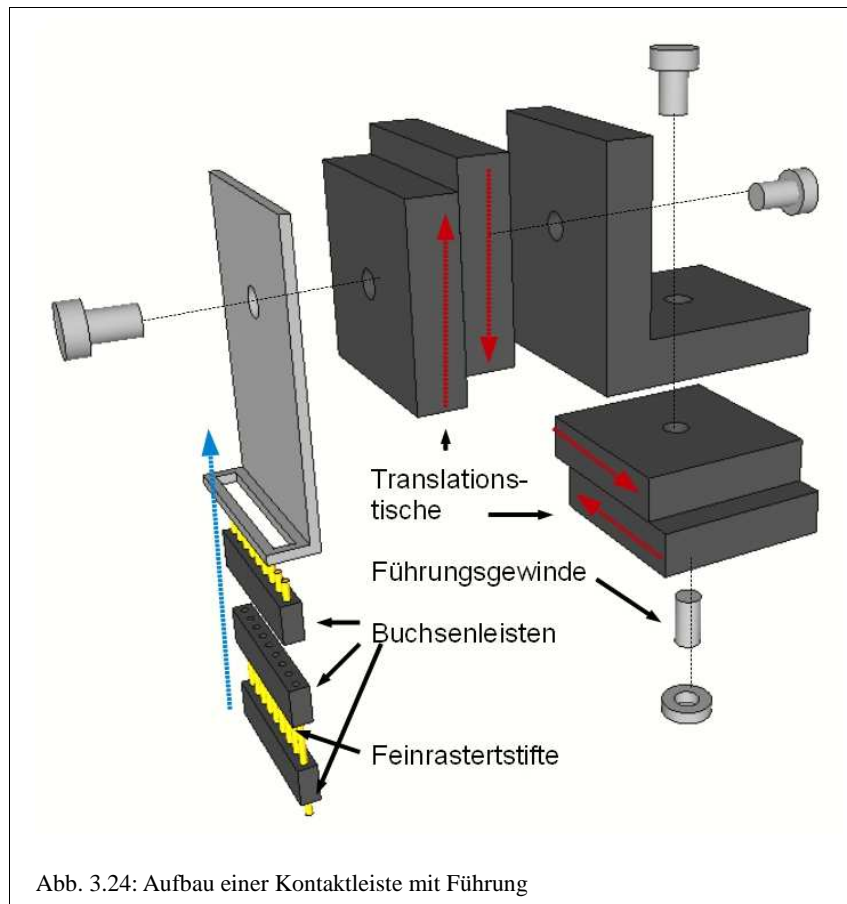


Abb. 3.22: Schematischer Aufbau eines Feinrasterstiftes gemäß dem Datenblatt [27]

Der Vorverstärker soll so direkt auf dem Biochip aufgebracht werden können. Des Weiteren wurde eine Halterung vorgesehen, auf der die oben beschriebenen Kontaktleisten mit den Translationstischen und der Biochip fixiert werden können.

Für eine Verstärkerschaltung ohne Vorverstärker wurde außerdem aus einer Stiftleiste, einem Koaxialkabel und einem Stecker (der dem Vorverstärkerausgang entspricht) ein entsprechendes Verbindungskabel von den Buchsenleisten zum Nachverstärker angefertigt. Tabelle 3.14 zeigt eine Übersicht über die benötigten Bauteile für den Aufbau der Kontaktleisten.



Bauteile für zwei Kontaktleisten mit justierbarer Führung				
Stück	Bauteil	Modell	Maße [mm]	Wichtiges
1	Vorverstärker	MPA8I	17 x 1,8 x 25	Rastermaß: 1,27 mm
6	Buchsenleiste	1 x 10 vergoldet	13 x 2,6 x 7	Rastermaß: 1,27 mm
20	Feinrastertstift	F109 01B 034 G 050	0,48 x 15,8	Federweg: 2 mm
4	Translationstisch	M-MT-X	20 x 20 x 10	Arbeitsweg: 9,5 mm
2	Winkelement	M-MT-AB2	25 x 20 x 25	Winkel: 90°
2	Winkelement	L-Profil (Alu)	5 x 20 x 30	Führung: 18 x 2,6 x 5 mm
1	Stiftleiste	1 x 10 vergoldet	13 x 2,2 x 8	Rastermaß: 1,27 mm
1	Stecker	SUB-D	30 x 20 x 10	15-polig
	Koaxialkabel		20 cm	15 geschirmte Kabel in einem

Tab. 3.14: Liste der Bauteile für zwei Kontaktleisten mit Führung

3.3.2 Kontakthalterung

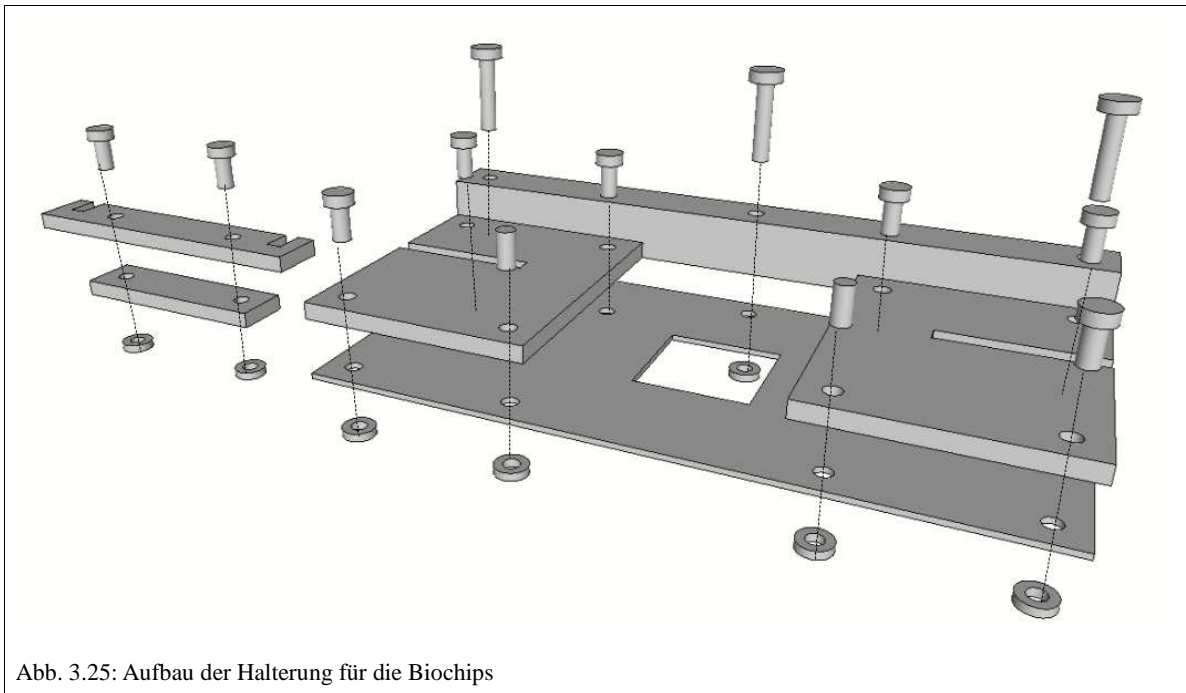


Abb. 3.25: Aufbau der Halterung für die Biochips

Um die Kontaktleisten auf dem Biochip ausrichten zu können, wurde eine Halterung angefertigt. Sie wurde aus Aluminiumplatten verschiedener Dicke (0,1 cm, 0,3 cm, 1 cm) sowie Schrauben (Durchmesser = 0,3 cm) angefertigt (siehe Abb. 3.25). Um später Bilder der gewachsenen Neuronen während der Ableitung auch mit einem Durchlichtmikroskop aufnehmen zu können, wurde ein Loch in der Mitte der Bodenplatte gefräst. Außerdem sind die vorgesehenen Führungsschienen für die Kontaktleisten sorgen für die Fixierung (siehe Abb. 3.26).

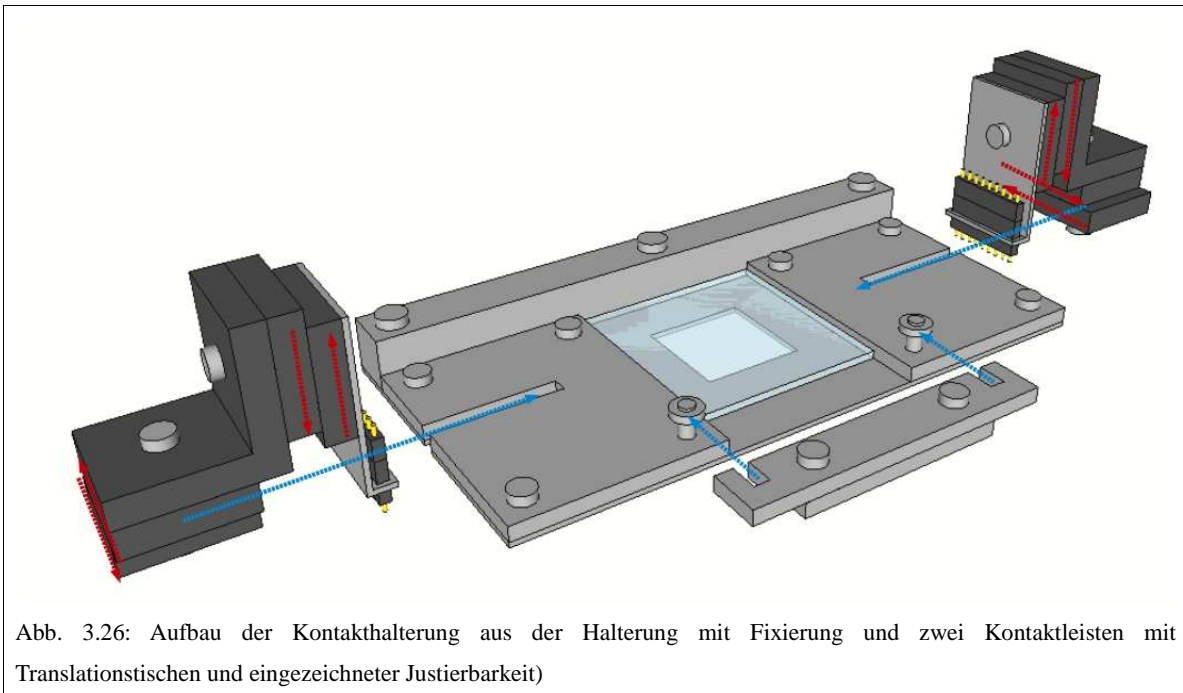


Abb. 3.26: Aufbau der Kontakthalterung aus der Halterung mit Fixierung und zwei Kontaktleisten mit Translationstischen und eingezeichneter Justierbarkeit)

3.4 Signalverstärkung

Weil die an den extrazellulären Elektroden auf den Biochips zu messenden Spannungsdifferenzen weit unter einem Millivolt betragen können (siehe Kap. 2.2.3), mussten die elektrischen Signale vor der Datenerfassung verstärkt werden. Dazu wurden Verstärkerplatinen (siehe Kap. 3.4.2) angefertigt, auf denen acht Eingangssignale von jeweils einem eigenen Analogverstärker (siehe Kap. 3.4.1) verstärkt werden. Zusätzlich wurde ein Hochpassfilter mit acht getrennten Kanälen (siehe Kap. 3.4.3) hergestellt.

3.4.1 Verstärkerspezifikationen

Für die Dimensionierung des Verstärkers ist auf ein sinnvolles Signal-Rausch-Verhältnis (engl.: Signal-noise-relation, **SNR**) zu achten. Dazu ist es von Vorteil, die Dauer und die erwartete Amplitude des zu messenden Signals abzuschätzen. Bei einer Dauer des zu erfassenden Aktionsimpulses (AI) von 1 ms und einer Auflösung von 100 Messpunkten ergibt bezieht sich das SNR auf einen Frequenzbereich von 100 kHz. Für die Bestimmung der erwarteten Signalamplitude ließe sich nun das Punkt-Kontakt-Modell (siehe Kap. 2.2.3) mit der bekannten Amplitude eines AI heranziehen. Diese Methode scheint jedoch recht aufwendig, daher beziehen sich weitere Überlegungen auf experimentell ermittelte Signalamplituden von 0,1 – 1 mV [30]. Als verstärkendes Element wurde wegen seiner Präzision ein Operationsverstärker (**OPV**) verwendet. Um auch bipolare Ableitungen zu ermöglichen, wurde ein Instrumentenverstärker Typ PGA202KP gewählt. Abb. 3.27 zeigt den prinzipiellen Aufbau des gewählten OPVs PGA202KP [31].

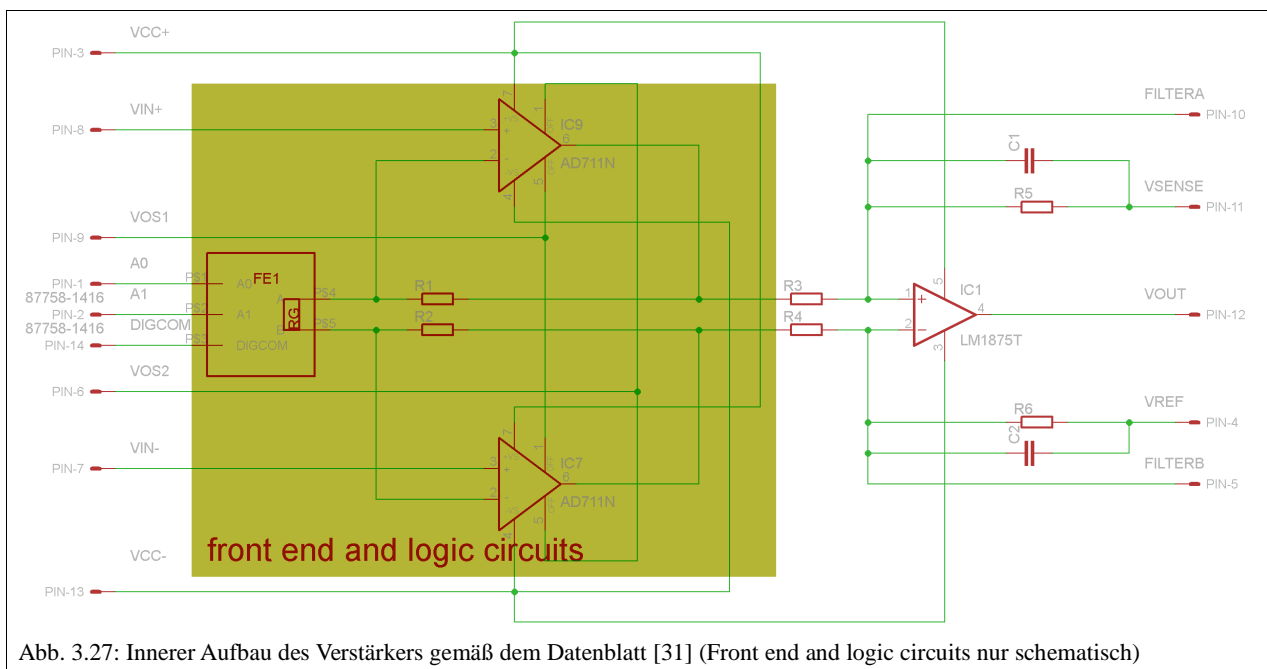
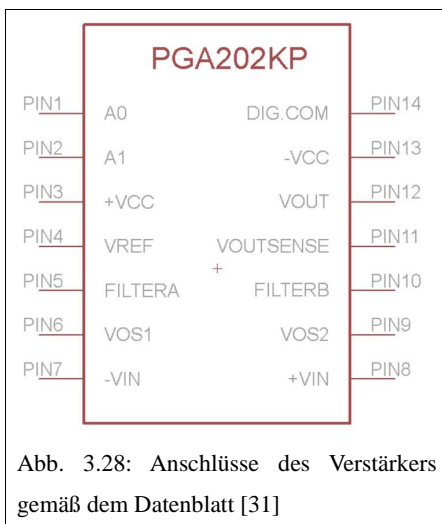


Abb. 3.27: Innerer Aufbau des Verstärkers gemäß dem Datenblatt [31] (Front end and logic circuits nur schematisch)

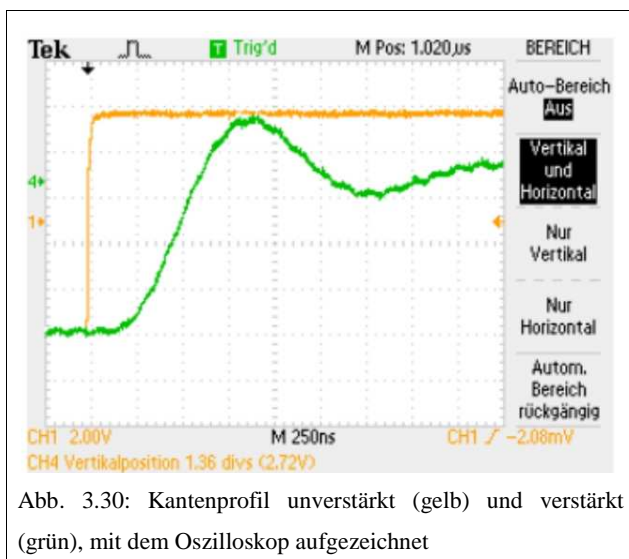


Er hat neben dem invertierenden und dem nicht-invertierenden Eingang (VIN-, VIN+) einen Ausgang (VOUT), zwei Anschlüssen für die Versorgungsspannung (VCC+, VCC-) sowie einem Anschluss für die Bezugsmasse (VREF), eine (Eingangs-) Offsetsteuerung (VOS1, VOS2), Anschlüsse für einen integrierten (Output-)Tiefpassfilter (FILTERA, FILTERB) sowie einen Fühler, um die Ausgangsspannung dem Ausgangswiderstand anpassen zu können (VOUTSENSE). Über die restlichen Anschlüsse(A0, A1, DIG COM) lässt sich der Verstärkungsfaktor einstellen. Die Anschlüsse des OPVs sind in Abb. 3.28 schematisch dargestellt. Tabelle 3.15 zeigt eine Übersicht über die relevanten Spezifikationen des OPVs PGA202KP (siehe Abb. 3.29).



Spezifikationen des Verstärkers		
OPV	PGA202KPG4	
Typus	Instrumentenverstärker	
Rauschen [μV]	Input	Output
Frequenzunabhängig	1,7μV	32μV
Zusätzliches Rauschen bei 100kHz	3,6μV	360μV
Verstärkungsfaktor	x10/x100/x1000	
Verstärkungsfehler [%]	<1%	
Offset [mV]	+/- 0,5-2mV	
Versorgungsspannung [V]	+/- 6-18V	

Tab. 3.15: Spezifikationen des OPVs PGA202KP im Überblick [31]



Um die Qualität des OPVs zu bestätigen, wurden mit dem Oszilloskop die Flanken des Signals vor und nach der Verstärkerschaltung miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass der OPV wenige Mikrosekunden benötigt, um sich auf einen konstanten Verstärkungsfaktor einzupendeln (siehe Abb. 3.30). Der Spannungsunterschied am Ausgang des Signalgenerators und am Verstärkerausgang erklärt sich aus dem dazwischen geschalteten Spannungsteiler.

3.4.2 Mehrkanalkonzept

Ziel dieser Arbeit ist es, an mehreren Elektroden simultan neuronale Signale aufzunehmen. Dafür wurde ein Verstärker mit mehreren einzeln verstärkten Eingängen angefertigt. Da der Vorverstärker 8 individuelle Eingänge besitzt, waren bei der Planung zwei 8-Kanal-Verstärkerplatinen mit OPVs unterschiedlichen Verstärkungsfaktors (x100/x1000) vorgesehen.

Die OPVs sollten austauschbar bleiben. Dazu werden Sockel für die OPVs auf einer Laborkarte zusammen mit **Stützkondensatoren** (die die Bezugsmasse bezüglich der Versorgungsspannung stabilisieren), **Filterkondensatoren** (für die integrierten Tiefpassfilter) und Buchsensteckern verlötet (siehe Abb. 3.31). Die Filterfrequenz des Tiefpassfilters wird mit den Filterkondensatoren auf 100 kHz festgelegt (auf diesen Wert bezieht sich auch das frequenzabhängige Rauschen des OPVs, siehe Kap. 3.4.1). Der Vorverstärker benötigt eine niedrigere Versorgungsspannung ($V_{cc} < 6\text{ V}$), weshalb eine eigene Stromversorgung für den Vorverstärker eingeplant wurde. Die Komponenten sind in Tab. 3.16 dargestellt.

Bauteile für die Verstärkerplatinen				
Stück	Komponente	Beschreibung	Hersteller	Modell
16	OPV	Instrumentenverstärker	Texas Instruments	PGA202KPG4
16	OPV-Sockel	6-Pol DIL-Sockel Flachprofil	Winslow	W30506TRC
2	Laborkarte	Sub-D 9-/15-polig	Roth Elektronik	RE224-HP
4	Buchsenstecker	Sub-D PCB 15-polig	Tyco Electronics	11634585-2
32	Filterkondensator	47pF 50V	Unbekannt	Unbekannt
32	Stützkondensator	1µF 50V DC	Panasonic	EEAGA1H1R0
2	Vcc Vorverstärker	Netzteil einphasig 5VDC/6,5A	Phoenix Contact	2868541
2	Vcc Nachverstärker	Bleiakku AGM 12V/2,0Ah	Ritar	RT 1220
2	Vcc Vergleich	Labornetzgerät 1-20 V/0-5 A	Manson	NRP-2050

Tab. 3.16: Liste der Bauteile für die beiden Verstärkerplatinen

Zu beachten ist, dass die invertierenden Signaleingänge (VIN-) sowie die Anschlüsse für den einzustellenden Verstärkungsfaktor (A0, A1, DIG COM), Versorgungsspannung (VCC+, VCC-) und Bezugsmasse (VREF) aller OPVs auf einer Verstärkerplatine verbunden werden. Damit sind die Verstärkerplatinen ausschließlich für monopolare Ableitung zu gebrauchen (siehe Kap. 2.2.5). Die invertierenden Eingänge messen also die Signalmasse einer Referenzelektrode und werden unter einem Eingang zusammengefasst, im Folgenden Signal Ground (SGN GND) genannt. Die Offsetsteuerung wird vorerst nicht verschaltet. In der Arbeit wurde jedoch untersucht, ob es nötig ist, die eingehenden Signale zusätzlich zu filtern.

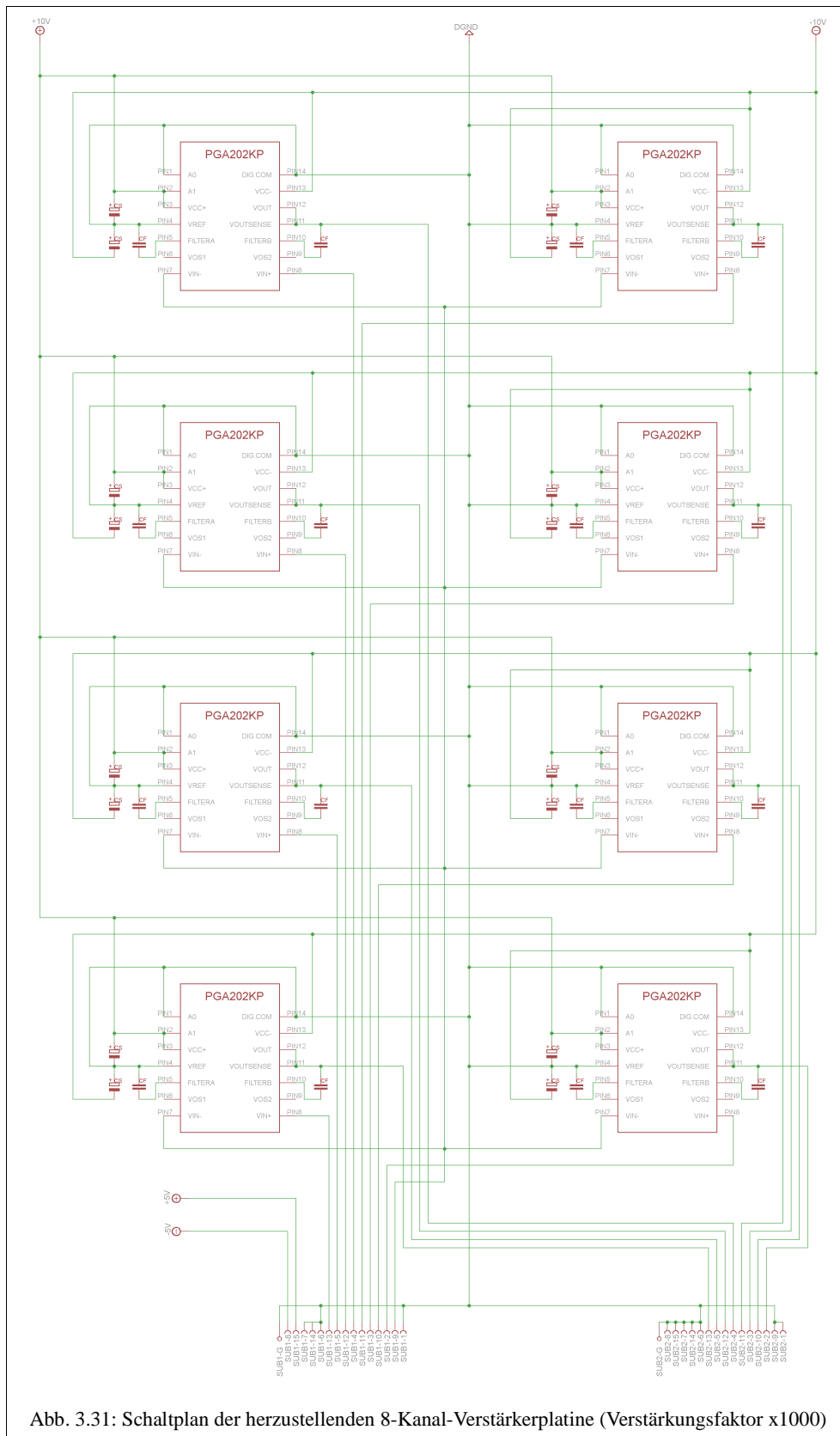


Abb. 3.31: Schaltplan der herzustellenden 8-Kanal-Verstärkerplatine (Verstärkungsfaktor x1000)

3.4.3 Hochpassfilterkonzept

Das Elektrodenpotential der Messelektroden ist nicht zeitlich konstant (siehe Kap.2.2.2) und die Elektrodenpotentiale der Messelektroden und der Referenzelektrode können sich stark unterscheiden. Dies führte dazu, dass Spannungsänderungen bei einem Verstärkungsfaktor von Tausend nicht mehr erfasst werden konnten, da die Spannung außerhalb des Auflösungsbereichs lag (siehe Kap. 4.4.1). Außerdem besteht aufgrund ungeschirmter Leitungen die Gefahr des kapazitiven Übersprechens durch niederfrequente Signale (meist $< 100\text{ Hz}$) aus der Umgebung. Um diese niederfrequente Signale (und damit auch die Differenz der Elektrodenpotentiale) herauszufiltern, wurde ein Hochpassfilter zwischen Vorverstärker und Hauptverstärker geschaltet.

Ein Hochpassfilter ist ein RC-Glied, welches vom eingehenden Signal (U_e) nur den höherfrequenten Teil passieren lässt, während niederfrequente Signalanteile abgeschwächt werden (U_a). Die Grenzfrequenz ist definiert als die Frequenz, bei der gilt: $U_a = U_e/\sqrt{2}$. Diese Grenzfrequenz bestimmt sich zu $f_g = 1/(2\pi RC)$. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass der Ausgangswiderstand kleiner ist als der Eingangswiderstand des folgenden Verstärkers ($10\text{ G}\Omega$), aber größer als der Eingangswiderstand an den Elektroden. Außerdem sollten die Kondensatoren unempfindlich gegenüber Polarisierungsänderungen sein, weshalb Folienkondensatoren gewählt wurden.

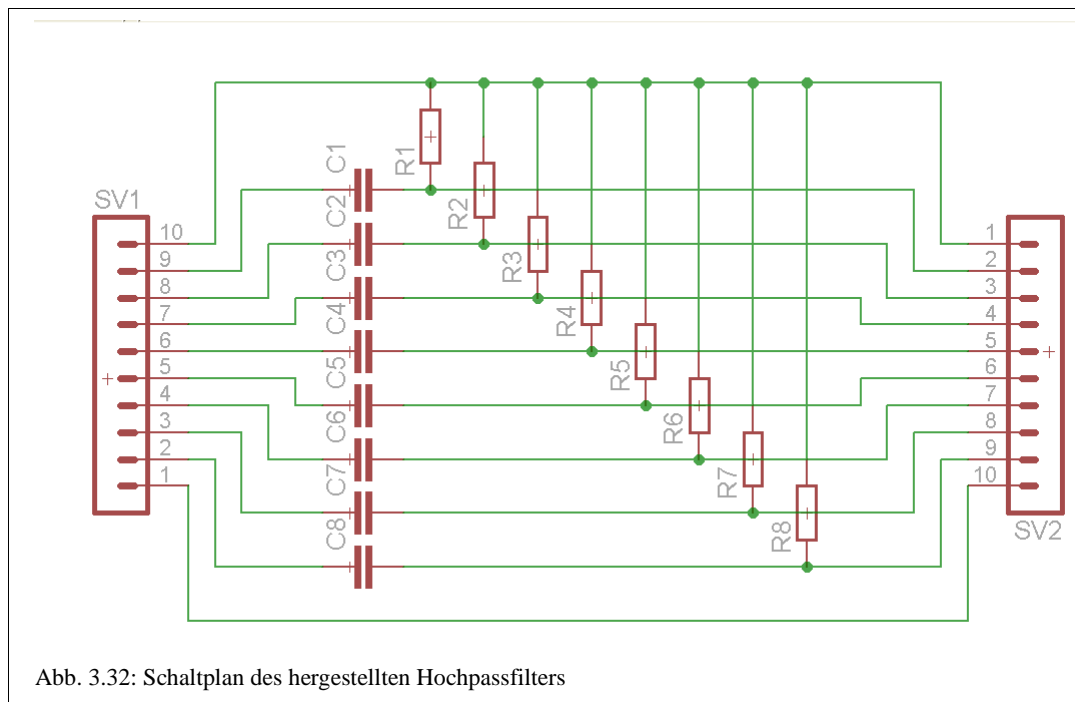


Abb. 3.32: Schaltplan des hergestellten Hochpassfilters

Um eine geeignete Dimensionierung des Hochpassfilters zu finden, wurde zunächst ein Hochpassfilter mit verschiedenen Filtern für jeden Kanal angefertigt. Tabelle 3.17 zeigt einen Überblick über die benötigten Bauteile für diesen Hochpassfilter. Alle Teile werden auf einer passenden Laborkarte gemäß Abb. 3.32 mit passenden Steckern (siehe Kap. 3.5.1) verlötet. Aus dem Vergleich des in den einzelnen Kanälen erzielten Signal-Rausch-Verhältnisses (siehe Kap. 4.5.4) ergibt sich eine optimierte Dimensionierung des Filters mit einem Widerstand von $100\text{ k}\Omega$ und einem Kondensator mit der Kapazität von 33 nF , womit die Grenzfrequenz bei 48 Hz liegt. Für alle folgenden Versuche wurde ein weiterer Hochpassfilter gemäß dem Schaltplan in Abb.3.32 angefertigt. Bei diesem optimierten Hochpassfilter wurden jedoch ausschließlich Widerstände von $100\text{ k}\Omega$ und Kondensatoren mit Kapazitäten von 33 nF verbaut.

Bauteile für den Hochpassfilter		
<u>Widerstand</u>	<u>Kapazität</u>	<u>Grenzfrequenz</u>
R1 = 47 kΩ	C1 = 33 nF	F1 = 113 Hz
R2 = 100 kΩ	C2 = 33 nF	F2 = 48 Hz
R3 = 1 MΩ	C3 = 33 nF	F3 = 4,8 Hz
R4 = 10 MΩ	C4 = 33 nF	F4 = 0,5 Hz
R5 = 47 kΩ	C5 = 1 μF	F5 = 3,3 Hz
R6 = 10 MΩ	C6 = 100 pF	F6 = 159 Hz
R7 = 1 MΩ	C7 = 100 pF	F7 = 1590 Hz

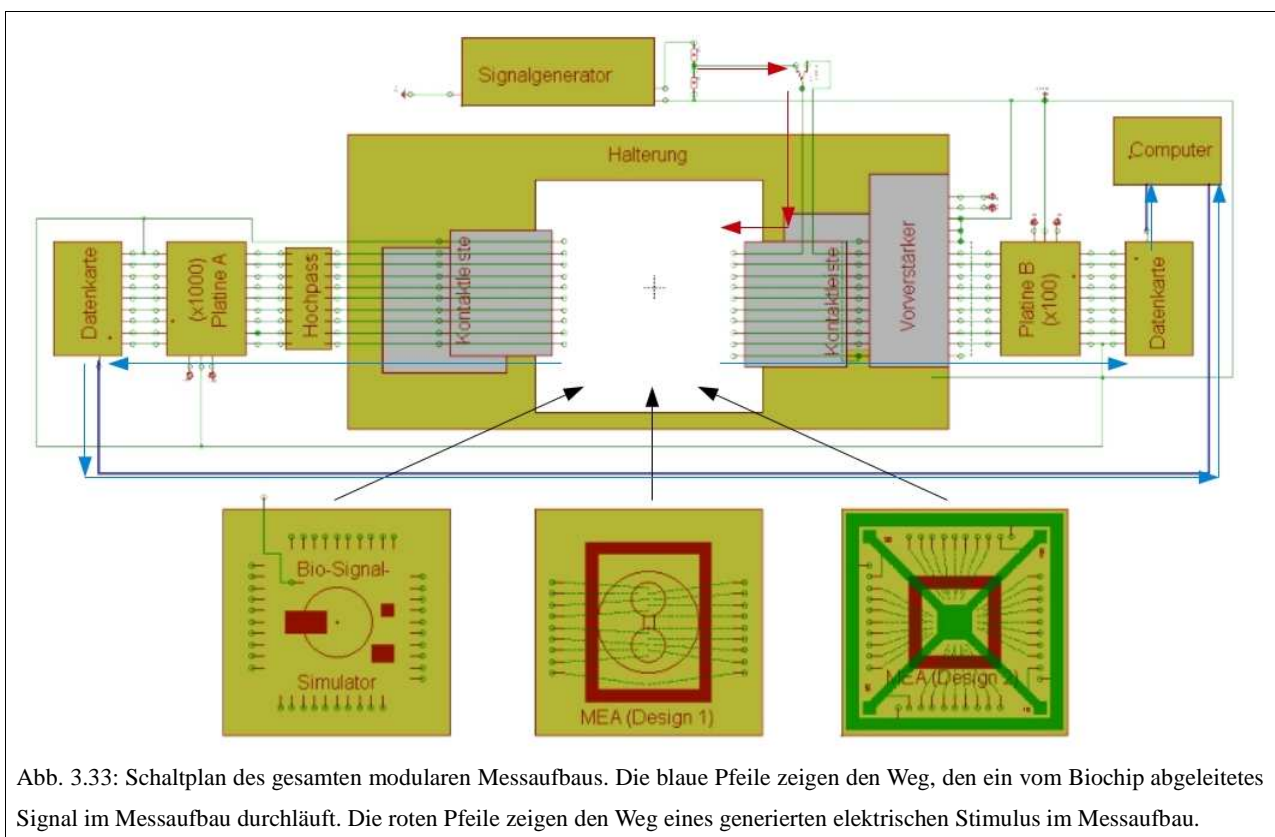
Tab. 3.17: Wahl der Widerstände und Kondensatoren für den Hochpassfilter sowie resultierende Grenzfrequenz für 7 Kanäle

3.5 Der Messaufbau

Im Gesamtsystem ist das Zusammenwirken von unterschiedlichen Komponenten zu koordinieren. Dabei ist jede Komponente an die jeweilige Messaufgabe anzupassen. Um diese schrittweisen Anpassungen während der Entwicklung zu ermöglichen, wurde ein Modulkonzept (siehe Kap. 3.5.1) ausgearbeitet. So können die Signalquellen (siehe Kap. 3.5.2) und die Komponenten zur Signalerfassung (siehe Kap. 3.5.3) ausgetauscht werden.

3.5.1 Modulkonzept

Damit der gesamte Messaufbau stets ausbaufähig bleibt, wurde ein Modulkonzept erarbeitet (siehe Abb. 3.33). Die zentrale Komponente des Aufbaus ist der von Multichannel Systems bezogene Vorverstärker (siehe Kap. 3.2.1, 3.3.1, 3.4.2, 3.4.3). An diese Komponente sind weitere Module angepasst.



So haben die Kontaktpads auf den Biochips und die Buchsenleisten das gleiche Rastermaß wie die Eingänge des Vorverstärkers. Die Anschlüsse der Datenkarte, der Hochpassfilterplatine sowie der Verstärkerplatten sind auf die Ausgänge des Vorverstärkers abgestimmt.

Das Kontaktkabel kann dabei anstatt des Vorverstärkers zur Verbindung von Messsystem und Biochip verwendet werden. So lassen sich die Komponenten auch unabhängig voneinander testen. Tabelle 3.18 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Module des Messaufbaus.

Der Messaufbau in Modulen				
<u>Aufgabe</u>	<u>Modul</u>	<u>Verbindungstyp</u>	<u>Pole (In / Out)*</u>	<u>Hersteller</u>
Elektrischer Kontakt zum Neuron	Biochip (Design 1)	Elektroden /	2x (10e / 10p)	Eigenproduktion
	Biochip (Design 2)	Pads RM: 1,27	4x (10e / 10p)	Eigenproduktion
Biochipkontakt	Kontakthalterung	2xRM: 1,27	2x (10f / 10f)	Eigenproduktion
Erste Verstärkerstufe	Vorverstärker 8x10	RM 1,27 /	11f / 15m	Multichannel Systems
	Kontaktkabel 8x1	SUB-D	11f / 15m	Eigenproduktion
Zweite Verstärkerstufe	Platine 8x100	SUB-D	15w / 15w	Eigenproduktion
	Platine 8x1000	SUB-D	15w / 15w	Eigenproduktion
Rauschreduktion	Hochpassfilter	SUB-D	15w / 15m	Eigenproduktion
Signalerzeugung	Signalgenerator	USB / Klemmen	f / 2k	Agilent
	Biosignalsimulator	Pads RM: 2,54	1p / 4x16p	Multichannel Systems
Signal Erfassung	Osilloskop	Klemmen / USB	4x2k / w	Tektronix
	Datenkarte	SUB-D / USB	15w / w	National Instruments
Datenspeicherung	Computer	USB	m	Software: Labview

Tab. 3.18: Übersicht über die für den Messaufbau benötigten Module * e = Elektroden, p= Pads, f = Feinrasterstifte, k = Klemmen, w = weiblich, m= männlich)

3.5.2 Signalgenerierung

Mit dem zuvor beschriebenen Verstärkeraufbau sollen Aktionsimpulse gemessen werden. Die Entstehung der AI kann entweder durch spontane neuronale Aktivität oder aber durch externe elektrische Stimulation zustande kommen. Zur Stimulation der Neuronen wurde ein Agilent 33220A Signalgenerator (siehe Abb. 3.34) eingesetzt. Der gewählte Signalgenerator kann kurze Pulse (Pulsdauer < 100 μ s) mit steilen Kanten senden, die über eine entsprechende Programmierung weiter moduliert werden können (siehe Abb. 3.34 [32]). So kann ein Aktionsimpuls elektrisch simuliert werden. Allerdings ist dies recht aufwendig. Die niedrigste mögliche Amplitude ist 20 mV, weshalb für die Kalibrierung des Messaufbaus ein Biosignalsimulator anstatt des vorher beschriebenen Signalgenerators herangezogen wurde.

Der Biosignalsimulator MEA-SG besitzt ein gröberes Rastermaß (siehe Abb. 3.35 [33]). Das stört jedoch nicht weiter, da für die Kalibrierung zwei Kanäle zum Vergleich ausreichen. Tabelle 3.19 zeigt einen Überblick über relevante Spezifikationen der gewählten Signalgeneratoren.

Wichtig ist, dass der Signalgenerator die ausgegebenen Spannungswerte für einen angelegten bekannten Lastwiderstand errechnet. Dieser ist bei Werkseinstellung auf 20 Ω angesetzt, für die Messungen werden jedoch meist hohe Widerstände eingesetzt. Bei unbekanntem Gesamtwiderstand kann dieser Umstand bei der Signalgenerierung mit der Option „High Z“ berücksichtigt werden, was einem angenommenen unendlich hohen Lastwiderstand entspricht.



Abb. 3.34: Signalgenerator Agilent 33220 [32]

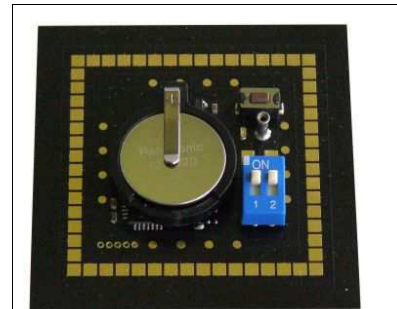


Abb. 3.35: Biosimulationschip MEA-SG [33]

Eingesetzte Signalgeneratoren und Spezifikationen	
<u>Signalgenerator</u>	
Modell	Agilent 33220 A LXI
Benutzte Signalformen	Rechteck, Sinus, Puls (0,04 – 1 ms)
Frequenz [Hz]	2 – 100
Amplitude [V]	0,02 – 20
Relevante Anschlüsse	SG +, SG -
<u>Biosignalsimulator</u>	
Modell	MEA-SG
Relevante Signalformen	EPSP, Population Spikes, Spikes
Frequenz [Hz]	Einige Milliherz
Amplitude [V]	100 μ V – 1 V
Relevante Anschlüsse	1 Masseanschluss 32 Ausgänge mit Signalform A 32 Ausgänge mit Signalform B

Tab. 3.19: Eigenschaften der elektronischen Signalquellen Signalgenerator und Biosignalsimulator

3.5.3 Datenerfassung

Damit die neuronalen Signale mit dem Computer aufgezeichnet und ausgewertet werden können, werden sie zunächst mit einer Datenkarte (siehe Abb. 3.36 [34]) digitalisiert. Dabei ist bei der Wahl der Datenkarte auf die Anzahl der Kanäle, die damit zur Verfügung stehende **Abtastrate** (Messpunkte/Zeiteinheit) pro Kanal, die maximale Eingangsspannung und den maximalen Fehler zu achten. Als analoges Referenzmessgerät wird ein Oszilloskop herangezogen (siehe Abb. 3.37, [35]) Die Datenerfassung und Nachbearbeitung schließlich benötigt eine mit der Datenkarte und dem Oszilloskop kompatible Software. Tabelle 3.19 zeigt einen Überblick über relevante Spezifikationen der eingesetzten Datenerfassungsmethoden.

Für die Abtastrate gilt dabei nach dem Nyquist-Theorem [36], dass diese mindestens doppelt so hoch sein muss wie die maximal zu messende Frequenz, um sie aufzeichnen zu können. Mit der gewählten Datenkarte entspricht die Abtastrate pro Kanal bei acht Kanälen 30 Kilosamples pro Sekunde (kS/s). Ein Signal kann also über die Dauer von einer Millisekunde, was der Dauer eines Aktionsimpulses entspricht, in 30 Messpunkten abgetastet werden. Dies sollte ausreichen, um Aktionsimpulse vom Rauschen unterscheiden zu können. Zur Veranschaulichung ist in Abb. 3.38 ein 5 ms dauernder Aktionsimpuls in 50 Messpunkten aufgelöst, also mit einer Abtastrate von 10 kS/s dargestellt.



Abb. 3.36: Datenkarte [34]

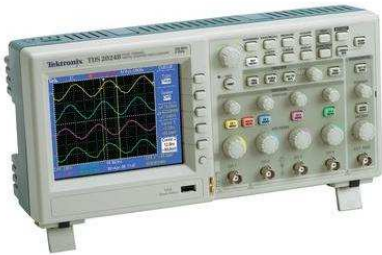


Abb. 3.37: Oszilloskop [35]

Überblick über die eingesetzten Datenerfassungsmethoden	
<u>Datenkarte</u>	
Modell	NI USB-6211
Abtastrate [kS/s]	250
Analoge Eingänge (AIN)	16 (monopolar) / 8 (bipolar)
Max. Eingangsspannung	+/- 10 V
Fehler	< 4 mV
<u>Oszilloskop</u>	
Modell	Tektronix TDS 2004B
Analoge Eingänge	4
<u>Datenerfassung</u>	
Software	Labview Signal Express 3.0

Tab. 3.20: Eigenschaften der Geräte zur Datenerfassung

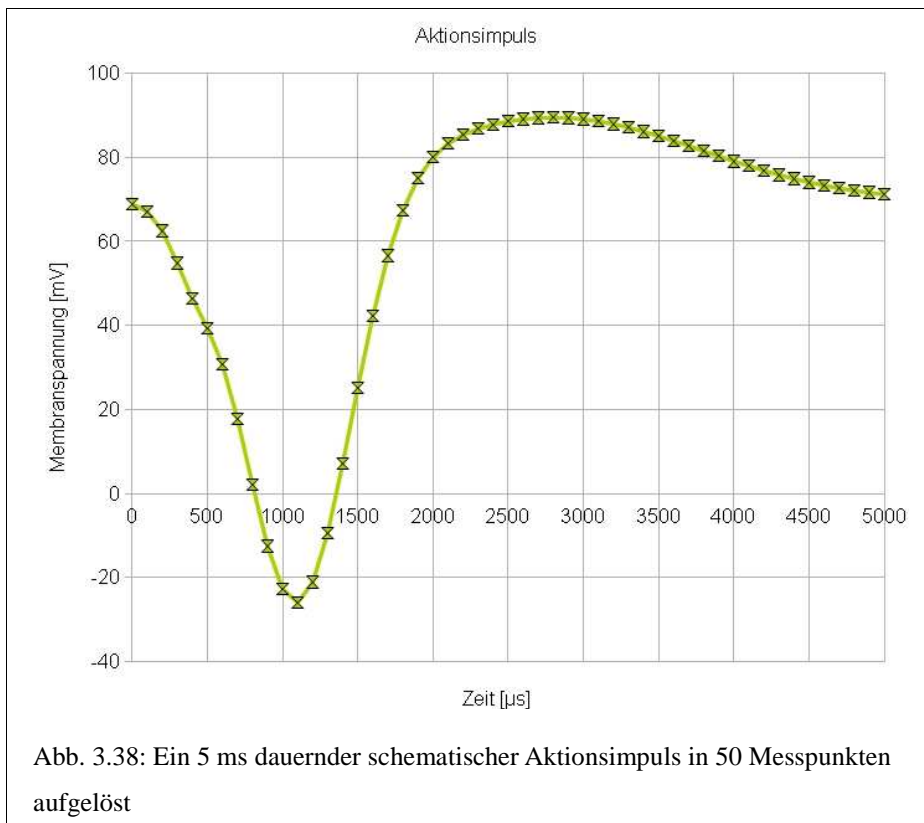


Abb. 3.38: Ein 5 ms dauernder schematischer Aktionsimpuls in 50 Messpunkten aufgelöst

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Konzeption, Realisierung und Charakterisierung ein Messsystem zur Ableitung neuronaler Aktivität. Vor der Beschreibung der Resultate soll ein Überblick über den Ablauf der Messung im Hinblick auf die dafür benötigten Geräte sowie auf die experimentelle Vorarbeit gegeben werden (siehe Abb. 4.1). In Folge sollen zuerst die Ergebnisse der MEA-Produktion (siehe Kap. 4.1) und der Biochipproduktion (siehe Kap. 4.2) in einzelnen Schritten präsentiert und in Hinsicht auf die Forschungsfragen (siehe Kap. 1) diskutiert werden. Außerdem soll eine Kalibrierung des Messsystems (siehe Kap. 4.3) mit speziellem Bezug auf die Wahl der Beschaltung (siehe Kap. 4.4) und auf verschiedene Methoden der Rauschreduktion (siehe Kap. 4.5) mit einer abschließenden Referenzmessung (Siehe Kap. 4.6) durchgeführt werden. Die unterschiedlichen experimentellen Konzepte sollen verglichen und hinsichtlich des Einsatzes für die Messung neuronaler Signale diskutiert werden. Zur genaueren Übersicht sind die Ergebnisse in Abb. 4.2 in Themenbereiche untergliedert dargestellt.

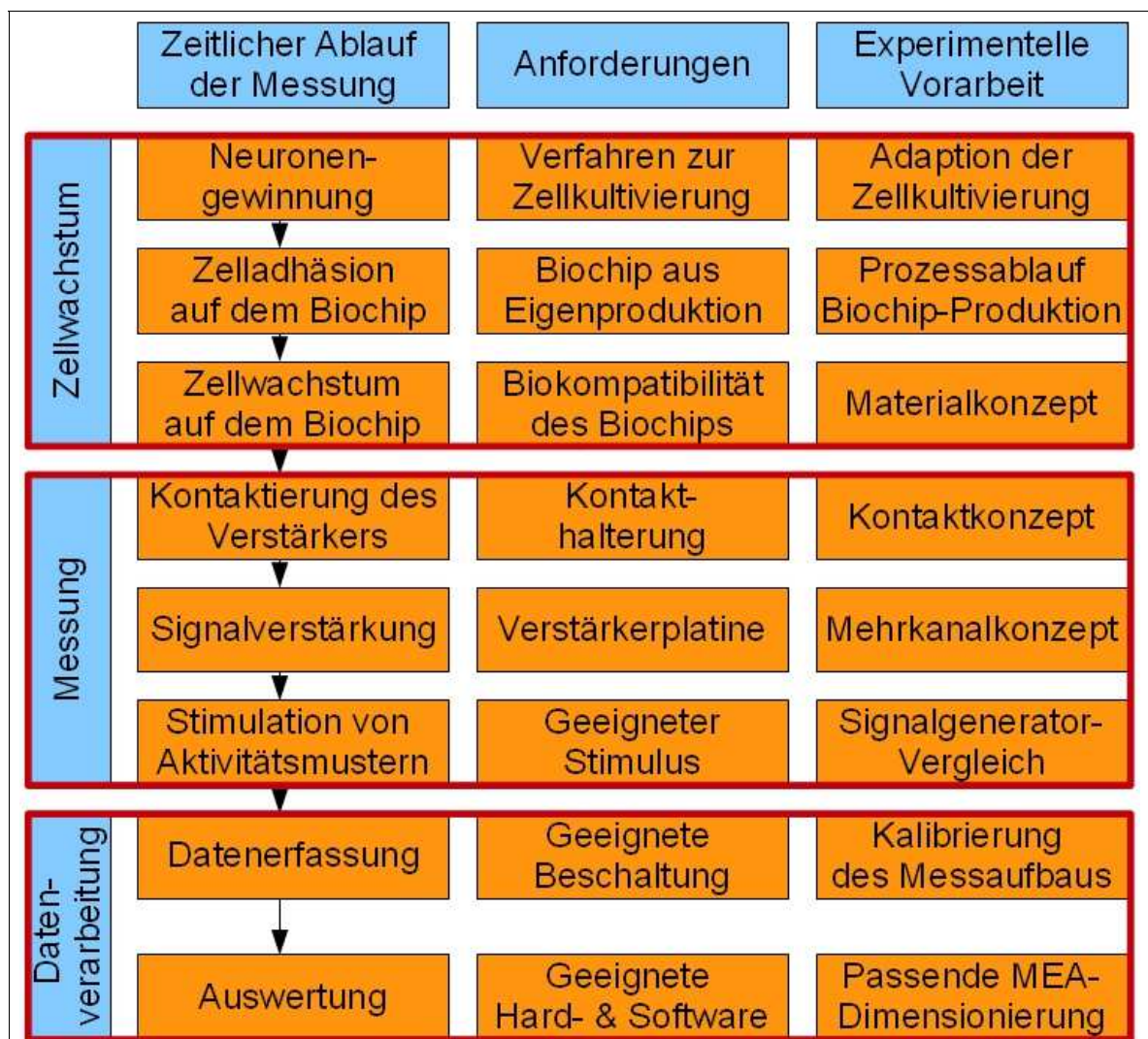


Abb. 4.1: Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Messung und Anforderungen an das Messsystem sowie die dafür benötigte experimentelle Vorarbeit

		Ergebnis	Behandelte Themen	Kapitel
Biochip		MEAs	<ul style="list-style-type: none"> • Biokompatibilität • Fertigung von MEAs 	4.1
		Biochip-Erweiterungen	<ul style="list-style-type: none"> • Elektrodenvergütung • Mikrokanäle • Zellkulturkammer 	4.2
Messaufbau	Aufbau	Messsystem	<ul style="list-style-type: none"> • Signalgenerierung • Digitale Datenerfassung 	4.3
		Kontakthalterung	• Isolierte Kontaktierung der Elektroden	
		Verstärkerschaltung	<ul style="list-style-type: none"> • Verstärkungsfaktor • 1- / 2-stufige Verstärkung 	
	Optimierung	Elektrodenbeschaltung	<ul style="list-style-type: none"> • Masseanschluss • Dreipunktmessung / Vierpunktmessung 	4.4
		Rauschreduktion	<ul style="list-style-type: none"> • Rauschquellen • Filterung 	4.5
		Bearbeitung	• Softwarebasierte Signalkonditionierung	
Evaluierung		Referenzmessungen	<ul style="list-style-type: none"> • Elektrodenabstand • Elektrodengröße 	4.6
		Messung	• Messung an neuronalen Zellkulturen	

Abb. 4.2: Übersicht über die Ergebnisse mit Kapitelverweis

4.1 MEA – Prozessierung

In dieser Arbeit sollen Neuronen auf selbst gefertigten Mikroelektrodenarrays (MEAs) anwachsen. Dazu muss die Biokompatibilität der Materialien des Biochips gewährleistet sein. Im folgenden wird die Eignung der zur Verfügung stehenden Materialien ermittelt (siehe Kap. 4.1.1), und aus den geeignetsten Materialien nach Beseitigung von Problemen im Prozessablauf (siehe Kap. 4.1.2) und einer anschließenden Optimierung (siehe Kap. 4.1.3) MEAs hergestellt (siehe Kap. 4.1.4).

4.1.1 Materialkonzept

Um die Biokompatibilität der Materialien der für die MEA-Produktion zu vergleichen, wurden verschiedene Deckgläser mit einer reinen Oberfläche aus einem zu vergleichenden Material beschichtet. Auf diesen Oberflächen wurden nach dem bereits bekannten Verfahren (siehe Kap. 3.1) Neuronen aufgebracht und kultiviert.

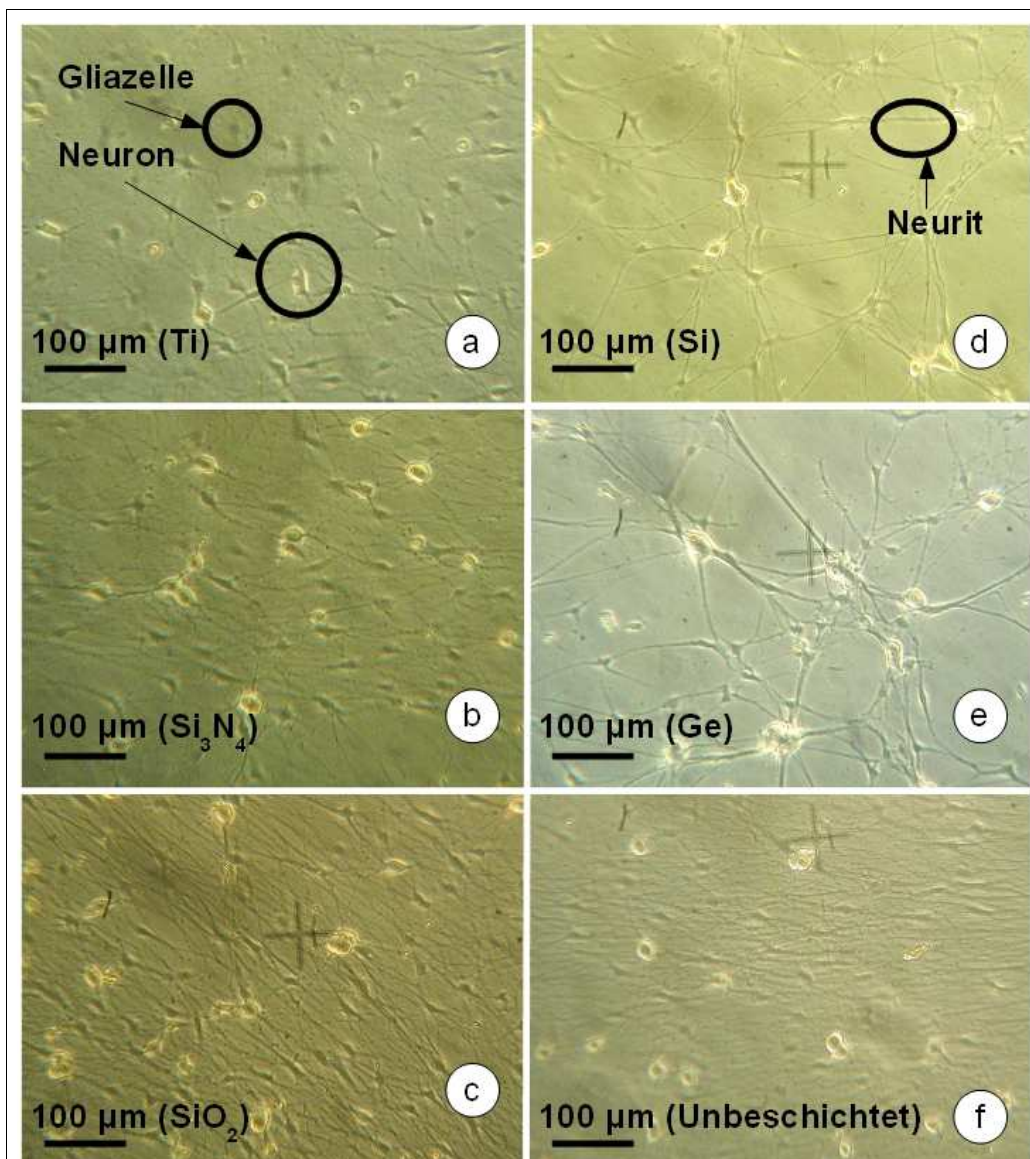


Abb. 4.3: Mikroskopische Aufnahmen von Maus-SCG-Zellen auf beschichteten Deckgläsern (DIV: 2). Beschichtung: a) Titan, b) Siliziumnitrid, c) Siliziumoxid, d) Silizium, e) Germanium, f) Unbeschichtetes Glas; a) – f) lebendes Gewebe; Durchlichtmikroskopie

Da der Adhäsionsvermittler besonders gut auf geladenen Oberflächen haftet und die Oberflächen der Deckgläser nach der Beschichtung ungeladen sein sollten, wurden die beschichteten Deckgläser vor der Beschichtung mit den Adhäsionsvermittlern mit Phosphorsäure behandelt. In gewissen zeitlichen Abständen wurde anschließend der Entwicklungsstand des Neuronennetzwerks mit Hilfe eines Mikroskops fotografisch festgehalten (siehe Abb. 4.3 – 4.6) und tabellarisch festgehalten (siehe Tab. 4.1). Dabei wurde für die Beurteilung der Biokompatibilität der Oberfläche neben der Zelldichte eine qualitative Beschreibung der Vernetzung dieser Zellen herangezogen. Anhand dieser Beurteilung wurden im weiteren die Materialien für die MEAs gewählt.

Die undurchsichtig beschichteten Deckgläser mussten dafür zum Transport fixiert werden. Mit der Fixierung ist die Entwicklung des Neuronennetzwerks abgeschlossen. Deswegen wurde der Zeitpunkt des Fixierens immer gleich gewählt. In unserem Fall wurde die Fixierung am fünften bzw. am vierzehnten Tag *in vitro* (engl. Day *in vitro*; **DIV**) durchgeführt. Der fünfte Tag *in vitro* ist ein beliebter Zeitpunkt für die Ableitung neuronaler Aktivität, da sich das Netzwerk bereits erholt hat, also wieder verwachsen ist, und die Neuronen noch sehr lernfähig sind [37].

Auf den Abb. 4.3 – 4.6 sind zwei Zelltypen zu sehen, Gliazellen und Neuronen (siehe Abb. 4.3.a). Dabei ist das Überleben beider Zelltypen von Interesse, da die Neuronen ohne das Stützgewebe nicht lange überlebensfähig sind. Diese Annahme wird beispielsweise durch die Entwicklung des Gewebes auf den mit Germanium beschichteten Deckgläsern bestätigt (siehe Abb. 4.3.e, 4.4.d, 4.6.d). Die Hintergrundfarben in den Aufnahmen des lebenden Gewebes (siehe u.a. Abb. 4.3) entsprechen der Farbe des Materials, mit dem das Deckglas beschichtet wurde.

Alle undurchsichtig beschichteten Deckgläser (siehe u.a. Abb. 4.4.f – h) wurden mit dem Auflichtmikroskop betrachtet. Dabei zeigen die Bilder in Fixiermittel konserviertes Neuronales Gewebe. Das Fixiermittel erzeugt dabei einen rötlichen Farbstich sowie Lufteinschlüsse. Die betroffenen Gebiete in der Zellkultur werden nicht konserviert, was zu einem Absterben der Zellen führt (siehe u.a. Abb. 4.4.f).

Es wurden zwei Messreihen durchgeführt, wobei in der ersten Messreihe die Haftung von Gold (vollkommen abgelöst) und Platin (teilweise abgelöst) unzureichend war. Außerdem wurde in der ersten Messreihe auf eine Behandlung des mit Silizium beschichteten Deckglases mit Phosphorsäure verzichtet, was zu einem schnellen Ablösen der Neuronen führte. Die Ergebnisse sind also nicht statistischer, sondern vielmehr exemplarischer Natur. Dabei sollte beachtet werden, dass die Zellkultivierung immer einer gewissen zufälligen Streuung unterliegt und keinesfalls 100%ig reproduzierbar ist. Eine Kontamination beispielsweise macht die Ergebnisse vollkommen unbrauchbar.

Als ein besonderes Ergebnis dieser Materialstudie soll noch erwähnt werden, dass die Neuronen auf Chrom nach 14 Tagen eine bevorzugte Orientierungsrichtung aufweisen (siehe Abb. 4.6.f), was mit der Kristallstruktur von Chrom zusammenhängen könnte. Ob das ein Nachteil ist oder sogar einen besonderen Zweck erfüllen könnte, wurde jedoch nicht näher untersucht. Tabelle 4.1 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse der Biokompatibilitätsstudie.

Um die Biokompatibilität der herzustellenden MEAs zu gewährleisten, empfehlen sich demnach als Leitermaterial Gold bzw. Platin, als Haftschiicht Titan bzw. Chrom und als Isolationsschicht Siliziumnitrid. Diese Materialien finden auch in industriell prozessierten MEAs Anwendung, weswegen der exemplarische Biokompatibilitätstest als hinreichend angenommen wird. Da schon bei der ersten Beschichtung der Deckgläser mit Gold Haftungsprobleme auftraten, soll im weiteren kurz auf die bei der MEA-Prozessierung aufgetretenen Probleme eingegangen werden.

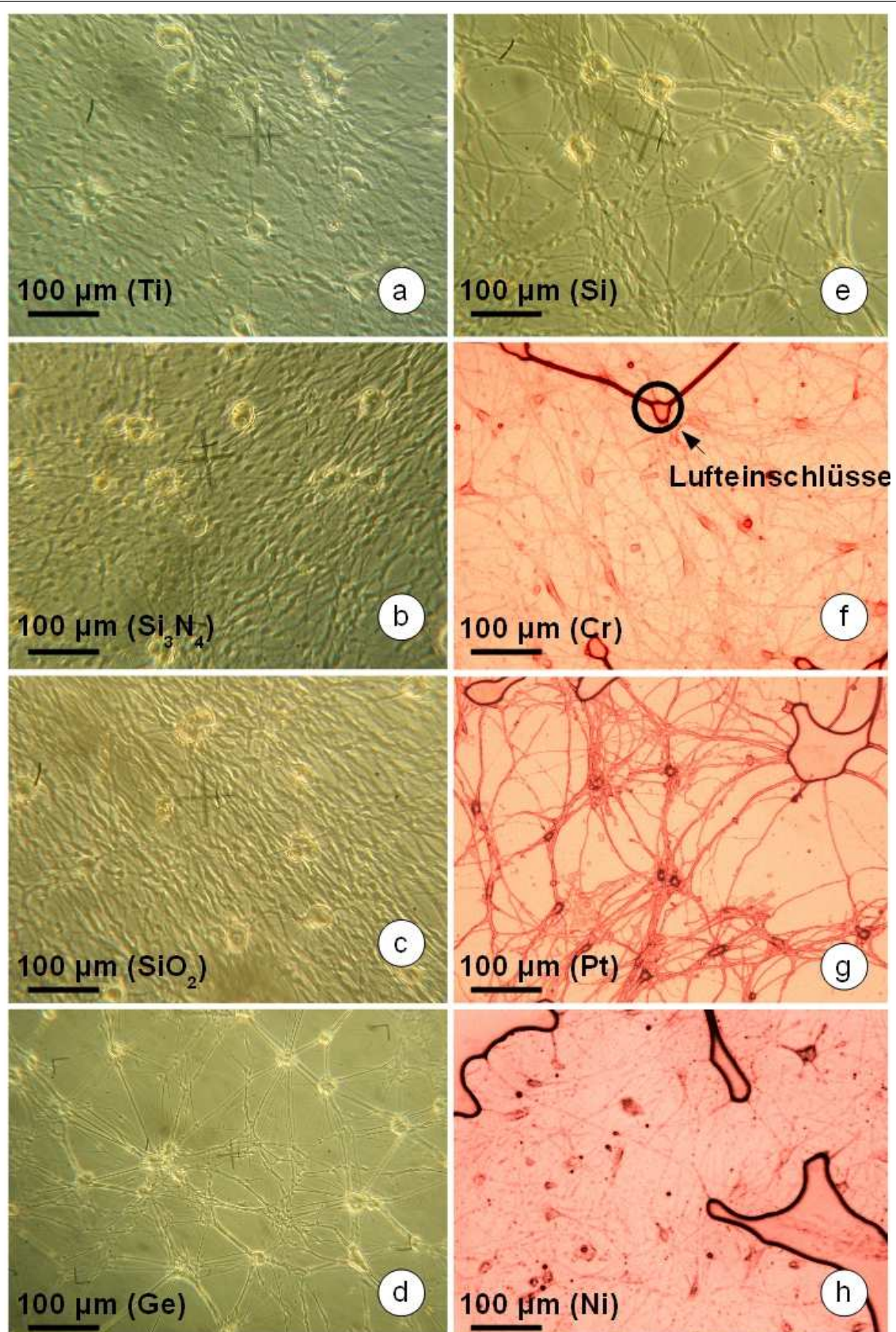
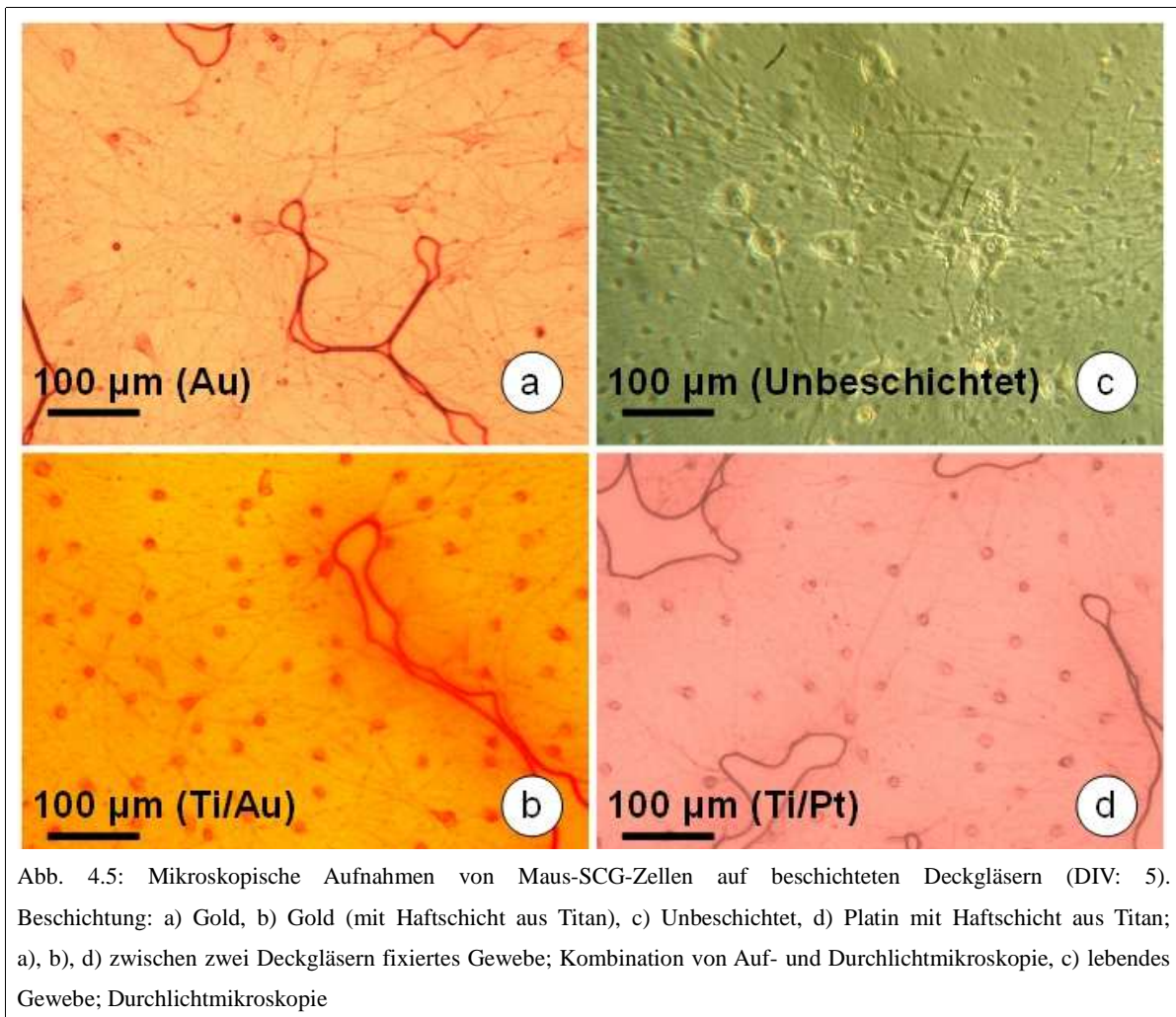


Abb. 4.4: Mikroskopische Aufnahmen von Maus-SCG-Zellen auf beschichteten Deckgläsern (DIV: 5). Beschichtung: a) Titan, b) Siliziumnitrid, c) Siliziumoxid, d) Germanium, e) Silizium, f) Chrom, g) Platin, h) Nickel; a) – e) lebendes Gewebe; Durchlichtmikroskopie, f) – h) zwischen zwei Deckgläsern fixiertes Gewebe; Kombination von Auf-und Durchlichtmikroskopie



Fortschritt der Zelladhäsion von Maus-SCG-Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen				
Beschichtung	DIV: 2	DIV: 5/6	DIV: 14	Eignung
Silizium	Ablösen d. Zellen	Zellen abgelöst	verzweigt	unsicher
Siliziumoxid	kaum verzweigt	verzweigt	verklumpt	gut
Siliziumnitrid	kaum verzweigt	fein verzweigt	fein verzweigt	optimal
Unbeschichtet	kaum verzweigt	verzweigt	stark dissoziiert	
Germanium	Ablösen d. Zellen	Zellen abgelöst	aufgelöst	tödlich
Titan	kaum verzweigt	fein verzweigt	fein verzweigt	optimal
Nickel	-	fast aufgelöst	Stark dissoziiert	schlecht
Chrom	-	fein verzweigt	orientiert	sehr gut
Platin	-	Zellen abgelöst	stark dissoziiert	unsicher
Gold	-	verzweigt	-	gut
Titan / Gold	-	fein verzweigt	-	sehr gut
Titan / Platin	-	fein verzweigt	-	sehr gut

Tab. 4.1: Fortschritt der Zelladhäsion von Maus-SCG-Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen (DIV: 2, 5 und 14)

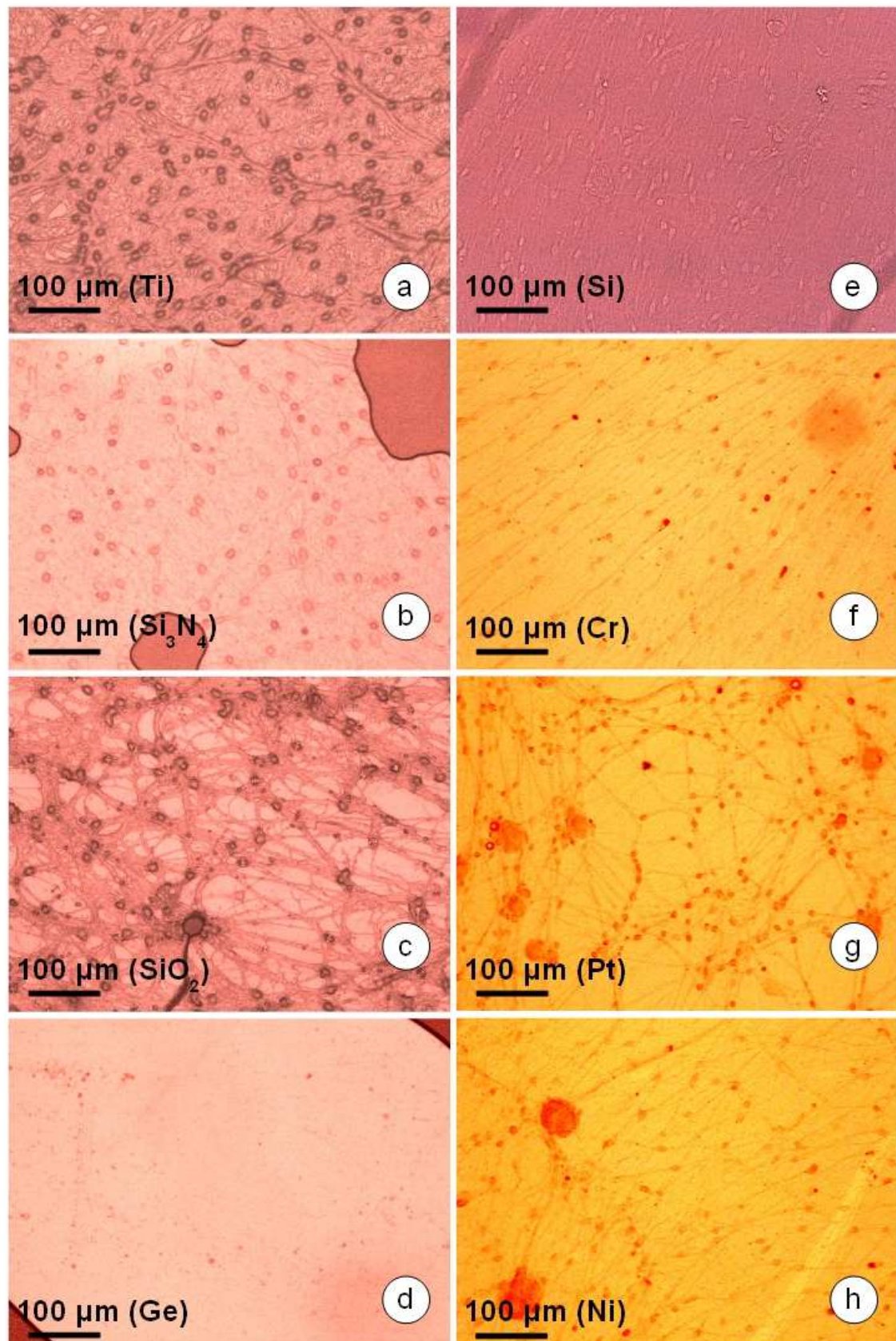


Abb. 4.6: Mikroskopische Aufnahmen von Maus-SCG-Zellen auf beschichteten Deckgläsern (DIV: 14). Beschichtung: a) Titan, b) Siliziumnitrid, c) Siliziumoxid, d) Germanium, e) Silizium, f) Chrom, g) Platin, h) Nickel; a) – h) zwischen zwei Deckgläsern fixiertes Gewebe, Kombination von Auf- und Durchlichtmikroskopie

4.1.2 Probleme im Prozessablauf

Die MEA-Prozessierung mit Hilfe mikroelektronischer Beschichtungsverfahren weist einige Tücken auf, die hier diskutiert werden sollen. Zu Beginn der MEA-Prozessierung wurden Herstellparameter zur Prozessierung eines Mikroelektrodenarrays herangezogen, die sich für die Herstellung eines MEAs für Bio-Impedanzmessungen an Caco-2-Zellen als geeignet herausgestellt haben [38]. Dieser Gesamtprozess wurde auf die Problemstellung dieser Arbeit abgestimmt (siehe Kap. 4.1.3). Im Folgenden wird auf einige prozesstechnische Schwierigkeiten im Detail eingegangen.

Reinigung (Prozessschritt a)

Eine mangelhafte Reinigung des Trägersubstrats kann die Struktur der darauf aufgetragenen Leiter- oder Isolationsschicht maßgeblich verändern. Dies gilt insbesondere für die zur Zellkultivierung eingesetzten Deckgläser. Die Strukturuntersuchung mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (engl. Atomic force microscope; **AFM**) eines unbehandelten Deckglases (siehe Abb. 4.6.a) zeigt auf der ansonsten glatten Oberfläche vereinzelt Erhebungen von bis zu 21 nm Höhe. Dabei wachsen diese Erhebungen bei der Beschichtung (siehe Abb. 4.6.b). Es konnte zwar nicht geklärt werden, ob es sich dabei wie vermutet um eine Vorbeschichtung handelt, aber mit einer eingehenden Reinigung der Deckgläser im Ultraschallbad wurden die Erhebungen für die Biokompatibilitätstests (siehe Kap. 4.1.1) und für die Rauigkeitsmessungen abgeschiedener Titannitridschichten (siehe Kap. 4.2.1) erfolgreich entfernt.

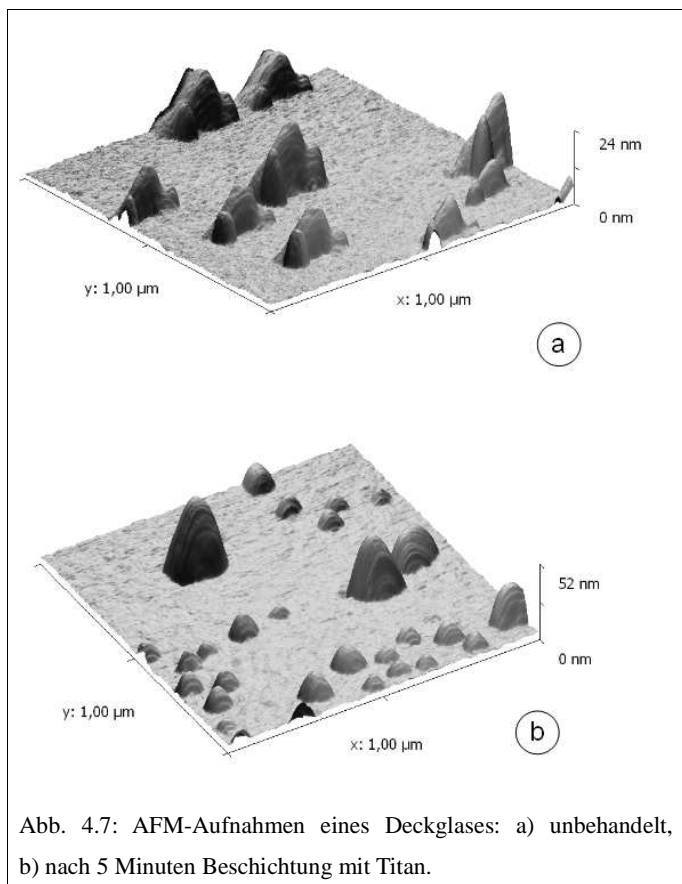


Abb. 4.7: AFM-Aufnahmen eines Deckglases: a) unbehandelt, b) nach 5 Minuten Beschichtung mit Titan.

Sputtern (Prozessschritte b, e, f, l)

Auch beim Sputterprozess kam es zu besonderen Herausforderungen. Das Sputtern der meisten Materialien ist von den Prozessparametern her gut bestimmt und verläuft weitgehend problemlos. Beim Sputtern der Oberflächenvergütung aus Titannitrid allerdings war das Ziel eine hohe Oberflächenrauigkeit. Zur Erhöhung der Rauigkeit wurden mehrere Prozessparameter variiert (siehe Kap. 4.2.1). Auf den für diese Untersuchungen als Substrat eingesetzten Deckgläsern befindliche Erhebungen wurden zuvor im Ultraschallbad entfernt.

Lithographie (Prozessschritte c, j)

Der wahrscheinlich problematischste Prozessschritt ist die Lithographie. Schon beim Auftragen des Lacks auf dem Substrat ist genau darauf zu achten, dass keine Luftblasen im Fotolack entstehen [39], damit die Rotationsbeschichtung problemlos verläuft. Vor allem die Belichtungszeit sollte sehr genau eingehalten werden, da

die endgültige Löslichkeit des Lacks stark davon abhängt (wodurch auch der Lift-off erheblich erleichtert werden kann). Aufgrund einer mechanischen Eigenheit des Mask-Aligners (die Belichtungsquelle wird nicht immer exakt positioniert) kann es schließlich am Rand des Trägersubstrats zu Effekten mangelnder Belichtung kommen (siehe Abb. 4.8). Dies gilt insbesondere deshalb, da das Trägersubstrat schon beinahe die komplette beleuchtete Fläche bedeckt. Dieser Prozessfehler trat nur sporadisch auf und konnte deswegen nicht weiter analysiert werden.

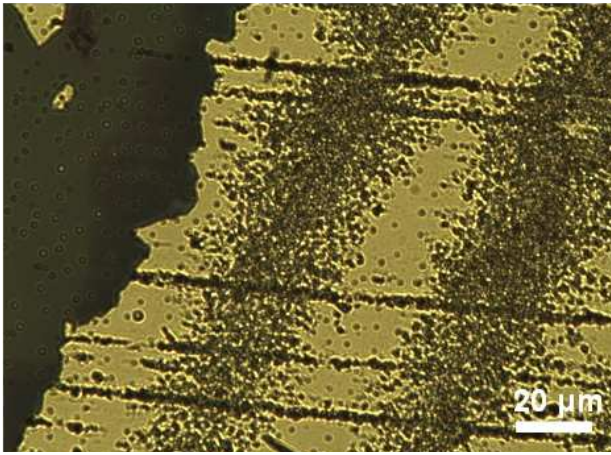


Abb. 4.8: Mikroskopische Auflichtaufnahme eines Belichtungsfehlers aufgrund mangelnder Belichtung der gesamten Fläche (Gold)

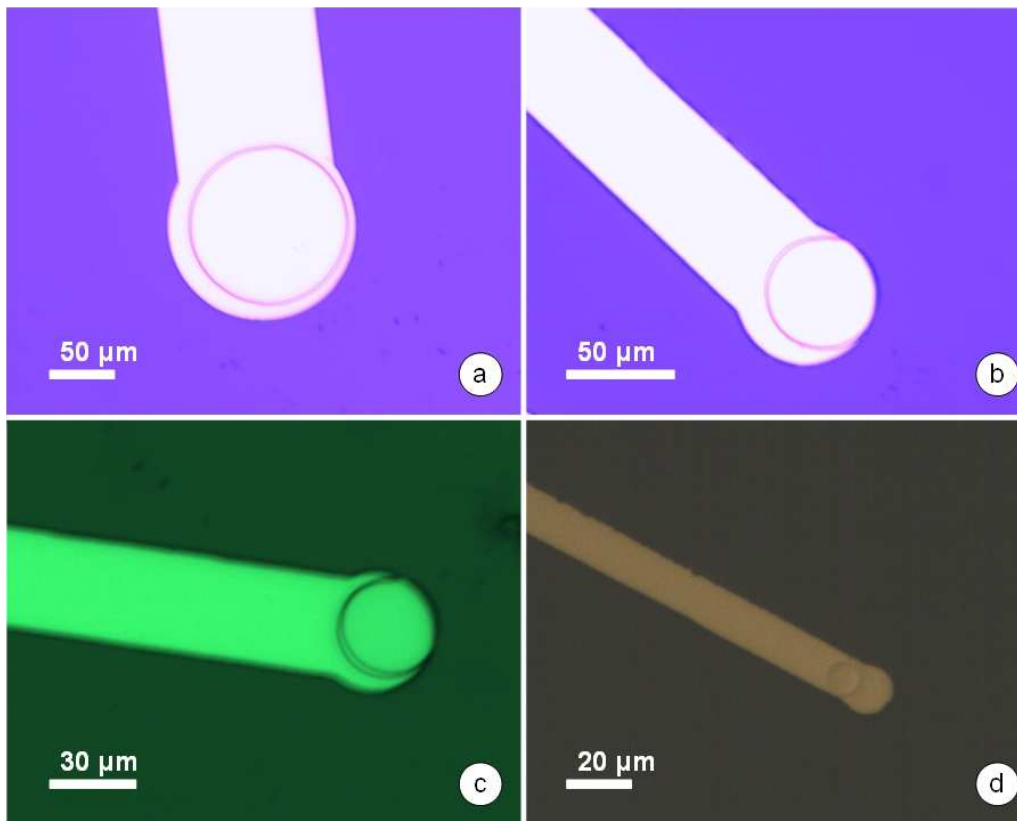


Abb. 4.9: Mikroskopische Auflichtaufnahmen der Elektroden mit strukturierter Isolationsschicht zur Alignmentbewertung bei unterschiedlichem Elektrodendurchmesser: a) 100 µm, b) 50 µm, c) 30 µm, d) 10 µm

Ein besonderes Problem bei der Lithographie stellt das Alignment dar. Die Strukturen für die Ätzlöcher sollen direkt über den Elektroden aufgebracht werden, wozu die Alignmentstrukturen auf den Lithographiemasken herangezogen werden können. Würden die Ätzlöcher mit einem Positivprozess beschichtet werden, dann würde sich das Alignment recht aufwendig gestalten, da während der Positionierung der Lithographiemaske die Elektroden nur durch die Öffnungen für die Ätzlöcher betrachtet werden können. Das Ergebnis dieser Ausrichtung ist unbefriedigend. Ab einem Elektrodendurchmesser von 30 µm kann wegen der schwierigen Ausrichtung nicht gewährleistet werden, dass sich unter der gesamten freigeätzten Fläche Leitermaterial befindet, obwohl die Elektroden etwas größer gewählt wurden als die Ätzlöcher (siehe Abb. 4.9). In diesem Fall wäre durch Ausrichtungsfehler die effektive Elektrodenfläche verringert, was auf die Messergebnisse Auswirkungen hätte. Im Rahmen der Optimierung des Prozessablaufs (siehe Kap. 4.1.3) konnte das Alignment verbessert werden.

Des weiteren erwies es sich als wichtig, dass nach der Entwicklung gründlich mit Wasser nachgespült oder Lackreste im Ultraschallbad entfernt werden. Verbleibende Lackreste führten dazu, dass eine ganze Produktionsserie an mangelnder Haftung des Leitermaterials scheiterte.

Lift-off (Prozessschritte g,m)

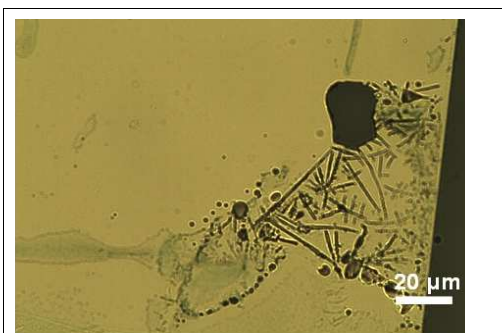


Abb. 4.10: Mikroskopische Auflichtaufnahme einer beim Lift-off zerkratzten Goldbeschichtung

Der Lift-off ist ein weitgehend robuster Prozessschritt. Durch punktuell eingespritztes Lösungsmittel kann das Ablösen beschleunigt werden, jedoch können bei geringstem Kontakt der Nadelspitze mit der Metallschicht auf dem Trägersubstrat erhebliche Schäden entstehen (siehe Abb. 4.10). Deshalb wurde in dieser Arbeit das punktuell eingespritzen mit Stahlkanälen unterlassen.

PECVD (Prozessschritt i)

Eine Schwierigkeit bei der Analyse des oben genannten Problems war, dass sich die Haftungsprobleme erst nach der PECVD-Beschichtung zeigten. Das PECVD-Verfahren selbst ist dabei eigentlich unkritisch. Aber das Erhitzen des Trägersubstrats und die thermische Verspannung der abkühlenden Isolationsschicht können zum Ablösen von schlecht haftenden Teilen der Leiterbahnen führen (siehe Abb. 4.11). Diese Produktionsfehler konnten durch eine eingehende Spülung nach der Entwicklung (siehe weiter oben) vermieden werden.

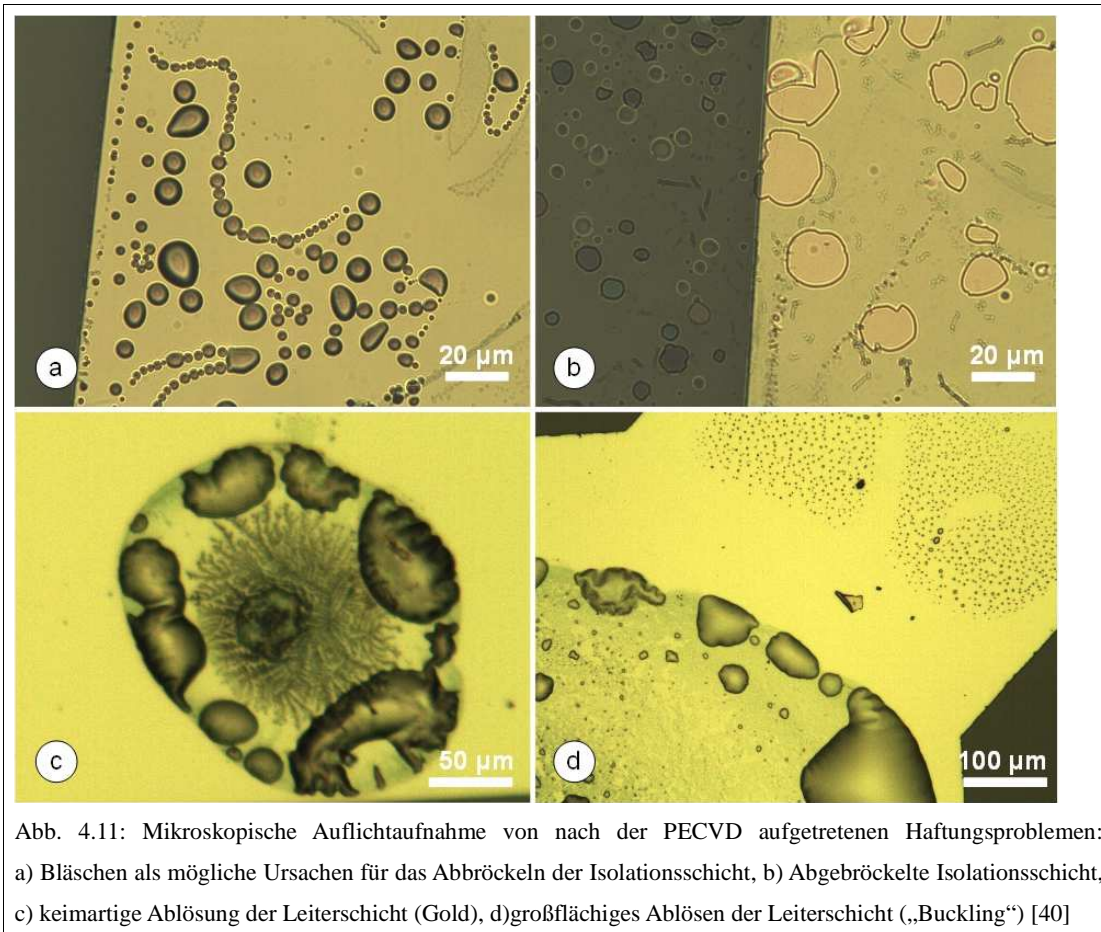


Abb. 4.11: Mikroskopische Auflichtaufnahme von nach der PECVD aufgetretenen Haftungsproblemen: a) Bläschen als mögliche Ursachen für das Abbröckeln der Isolationsschicht, b) Abgebröckelte Isolationsschicht, c) keimartige Ablösung der Leiterschicht (Gold), d) großflächiges Ablösen der Leiterschicht („Buckling“) [40]

RIE (Prozessschritt k)

Beim Freiätzen der Elektroden durch das RIE-Verfahren sollte das Reaktionsgas die Schichtdicke der Isolationsschicht durch ätzen. In einem ersten Vorversuch mit 10 Min. Ätzdauer konnte die 360 nm dicke Siliziumnitridschicht nicht geätzt werden. Die Vollständige Entfernung der Nitridschicht konnte leicht mit einem Widerstandsmessgerät an den Kontaktpads überprüft werden. Dabei sollte angemerkt werden, dass freigeätzte Kontaktpads mit einer Fläche im Bereich von 50 mm² noch nicht mit freigeätzten Mikroelektroden mit einer Fläche im Bereich von 300 µm² gleichzusetzen sind, da kleine Flächen bei gleicher Ätzdauer weniger tief geätzt werden [41]. Im Rahmen der Optimierung des Prozessablaufs (siehe Kap. 4.1.3) konnte dieses Problem behoben werden.

4.1.3 Optimierung des Prozessablaufs

Wie in Kap. 4.1.2 dargestellt, waren zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit Optimierungen in einzelnen Prozessschritten nötig. Diese sind im folgenden beschrieben.

Beseitigung von Haftungsproblemen der Leiterbahnen

Auf der Suche nach den Ursachen der Haftungsprobleme der Metallstrukturen auf Glas (siehe Kap. 4.1.2) wurde ein zusätzlicher Schritt nach der Entwicklung eingeführt, bei dem das Trägersubstrat intensiv gespült oder im Ultraschallbad von Lackresten befreit wird. So treten diese Probleme nur noch vereinzelt auf.

Metallische Haftschicht

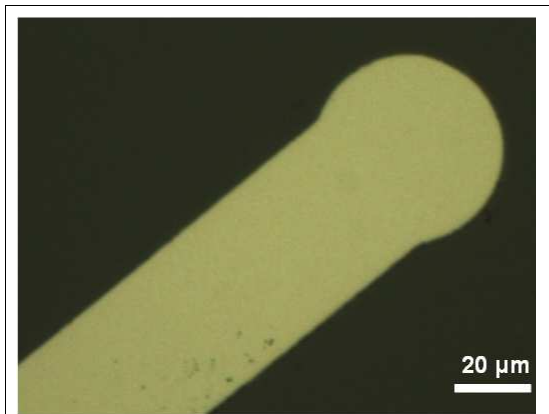


Abb. 4.12: Mikroskopische Auflichtaufnahme der strukturierten Chrom-Haftschicht

Auf der Suche nach Fehlerquellen für das in Kap. 4.1.2 beschriebene Haftungsproblem von Metall auf Glas wurde unter anderem Chrom als Haftmaterial für die Leiterbahnen getestet (siehe Abb. 4.12). Da dadurch die Haftung der Elektroden wesentlich besser gelang und sich die Biokompatibilität von Chrom und die von Titan im exemplarischen Vergleich nicht wesentlich unterschieden (siehe Kap. 4.1.1), wurde im weiteren Chrom als Haftmaterial eingesetzt. Diese Vorgangsweise bewährte sich in weiteren Versuchen.

Verbesserung der Ausrichtungsprozedur

Zur Optimierung des Alignments wurde für das Strukturieren der Isolationsschicht anstatt des Positivprozesses der Negativprozess angewandt. Damit können die Ätzlöcher genauer positioniert werden, da nun rund um die (dunklen) Ätzlöcher auf der Lithographiemaske zur Strukturierung der Isolation zur Positionierung hindurchgesehen werden kann. Dieser vergrößerte Sichtbereich ermöglicht eine bessere Ausrichtung.

Ätzdauer

Damit die Kontaktpads vollständig freigeätzt werden, wurde die Ätzdauer auf 12 Sekunden erhöht. Dadurch konnte die Nitridschicht vollständig entfernt werden. Dies wurde mit Hilfe einer Widerstandsmessung auf den Kontaktpads durch einen geringen elektrischen Widerstand bestätigt. Daher wurde angenommen, dass auch die Elektroden frei waren.

4.1.4 Herstellung der Mikroelektrodenarrays

Nachdem der Prozessablauf optimiert wurde (siehe Kap. 4.1.3), konnten reproduzierbar fehlerlose Multielektrodenarrays (MEAs) prozessiert werden. Dafür wurden wie in Kap. 3.2.1 beschrieben die Strukturen der MEA-Designs auf die Lithographiemasken, in den Lithographieschritten im Prozessablauf (siehe Kap. 3.2.2) in den Fotolack und durch Lift-off bzw. Ätzen in die Leiter- und Isolationsschichten auf dem Trägersubstrat übertragen.

Dabei wurden fürs erste MEA-Design 3 Lithographiemasken benötigt, welche in Abb. 4.13 neben dem produzierten MEA dargestellt sind. Die Pfeile deuten dabei an, welcher Teil des MEAs mit der jeweiligen Lithographiemaske strukturiert wurde. Die Elektroden selbst sind kaum zu erkennen (siehe 4.12.b Mitte). Die 2 mal 9 Elektroden im ersten Design sind alle gleich groß (Durchmesser: 100 μm) und sind über Leiterbahnen mit den Kontaktpads verbunden. Besonders zu beachten ist der Fluidikaufsatz in der Mitte des MEAs (siehe Abb. 4.12.c), welcher aus Fotolack besteht und mit der dafür vorgesehenen Lithographiemaske (siehe Abb. 4.13.d) strukturiert wurde. Dieser Fluidikaufsatz mit Mikrokanal (Breite: 300 μm) bildet den Boden der Zellkulturkammer, und soll später zwei Gebiete im neuronalen Netzwerk örtlich voneinander trennen. Für Details bezüglich der Herstellung dieses Kanals sei auf Kap. 4.2.2 verwiesen.

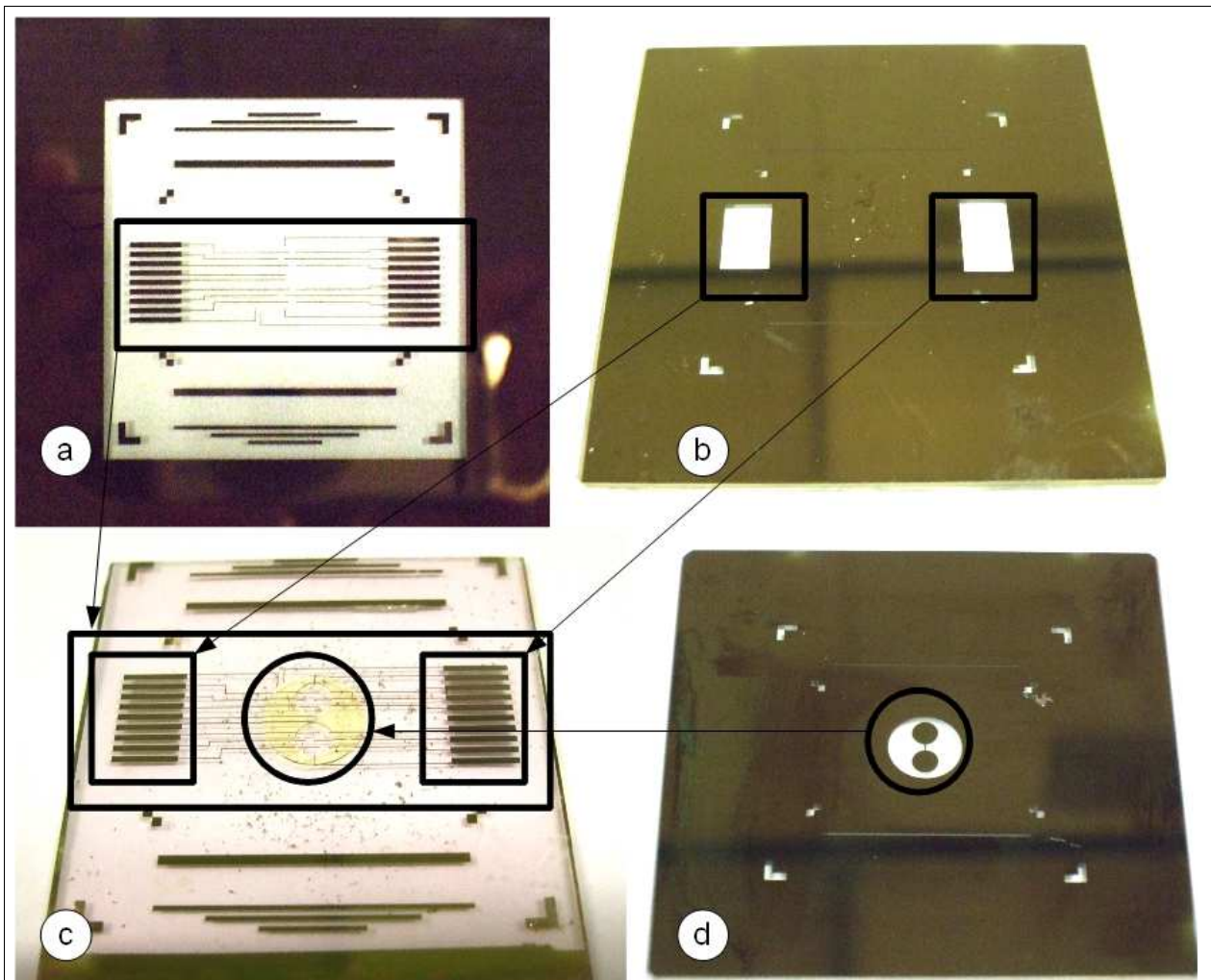


Abb. 4.13: Fotos der Lithographiemasken nach MEA-Design 1: a) Lithographiemaske zur Strukturierung der Isolation, b) Lithographiemaske zur Strukturierung der Isolation, c) MEA, d) Lithographiemaske zur Strukturierung des Kammerbodens

Im zweiten Design ist kein Fluidikaufsatz vorgesehen. Jedoch wurde wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben aufgrund schwierigen Alignments mit einem Positivprozess eine zusätzliche negative Lithographiemaske zur Strukturierung der Isolation (siehe Abb. 4.14.d) gefertigt. Dies ist insbesondere deswegen vorteilhaft, weil in diesem Design Elektrodendurchmesser von 10 μm vorkommen. Die verwendeten Lithographiemasken und das resultierende MEA nach Design 2 sind in Abb. 4.14 dargestellt. Auf den vier Seiten des MEAs (siehe Abb. 4.13.c) sind jeweils acht Elektroden gleicher Größe in einem rechteckigen Feld (2 x 4 Elektroden) in gleichem Abstand angeordnet. Die Größen und Abstände der Elektroden auf den vier Seiten sind dabei unterschiedlich, sodass durch Drehen des Biochips in der Halterung vier Arrays mit unterschiedlichen Elektrodendurchmessern angesteuert werden können.

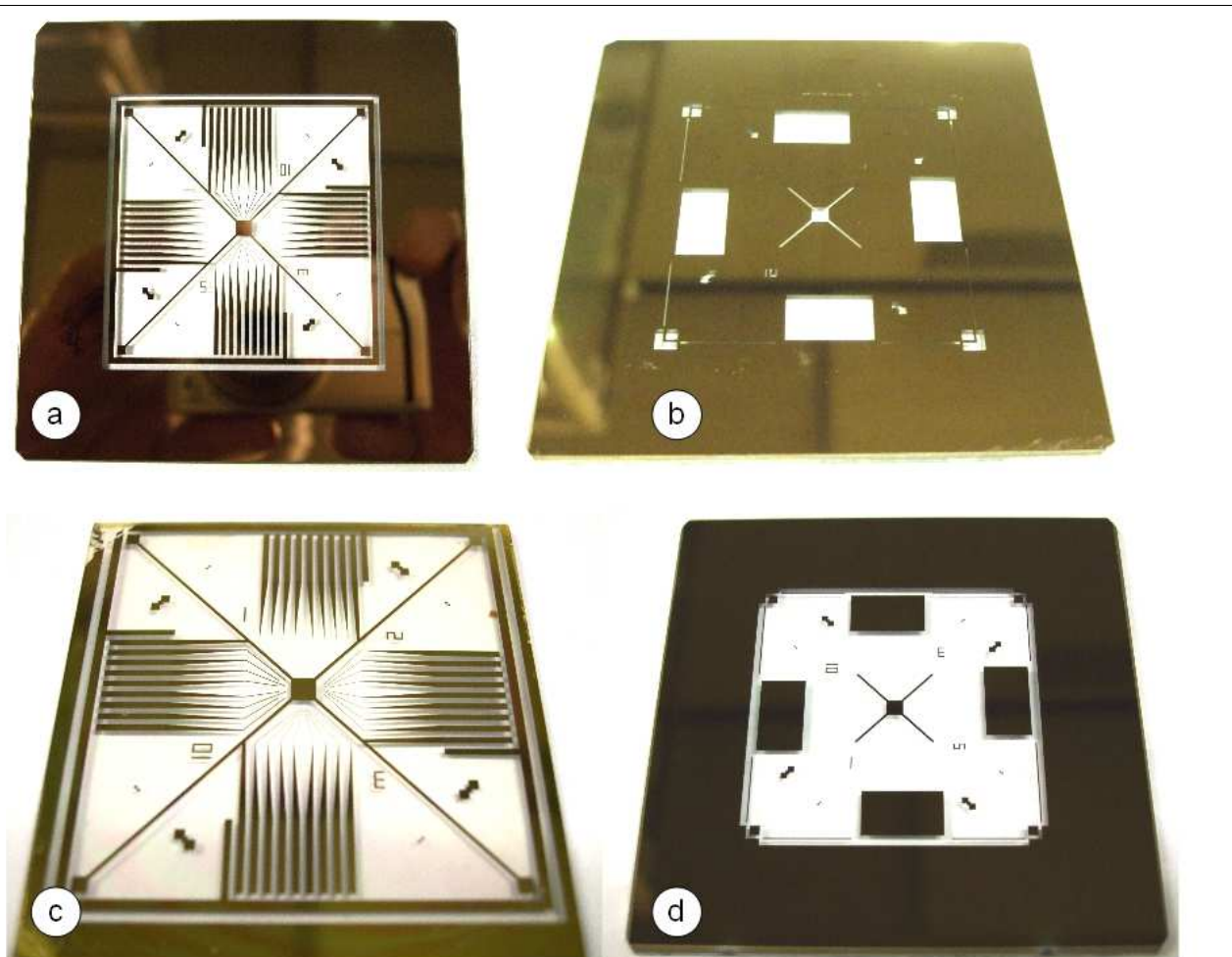


Abb. 4.14: Fotos der Lithographiemasken nach MEA-Design 2: a) Lithographiemaske zur Strukturierung der Leiterbahnen, b) Lithographiemaske zur Strukturierung der Isolation im Positivprozess, c) MEA, d) Lithographiemaske zur Strukturierung der Isolation im Negativprozess

4.2 Biochipprozessierung

Aus den prozessierten MEAs sollten im weiteren Prozessverlauf Biochips zur Ableitung neuronaler Aktivität gefertigt werden. Dazu wird nicht nur eine Zellkulturkammer (siehe Kap. 4.2.3), teils mit funktionalisiertem Boden (siehe Kap. 4.2.2) auf dem MEA, sondern auch eine spezielle Oberflächenvergütung zur Verbesserung der Zelladhäsion auf den Elektroden (siehe Kap. 4.2.1) benötigt. Die folgenden Prozesse und dazugehörige Prozessschritte (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.5) mussten erst entwickelt werden, weshalb im Weiteren die variierten Prozessparameter und deren Auswirkungen auf den Biochip diskutiert werden.

4.2.1 Oberflächenvergütung

Ziel der Oberflächenvergütung ist die Verbesserung der Zelladhäsion auf den Elektroden. Dies wird in der Praxis in der Regel mit einer Elektrodenbeschichtung mit Titannitrid erreicht. Dabei scheint die besondere Eignung von Titannitrid neben guter Biokompatibilität an der Rauigkeit, genauer an der Kornstruktur des Materials zu liegen [42]. Da sich praktisch alle Parameter zur Prozessierung einer solchen Oberflächenvergütung auf reaktives Sputtern beziehen [43], was bei der verwendeten Sputteranlage (siehe Kap.3.2.5) nicht möglich ist, wurden die Prozessparameter für reines Magnetronsputtern zunächst grob bestimmt. Die Struktur der gesputterten

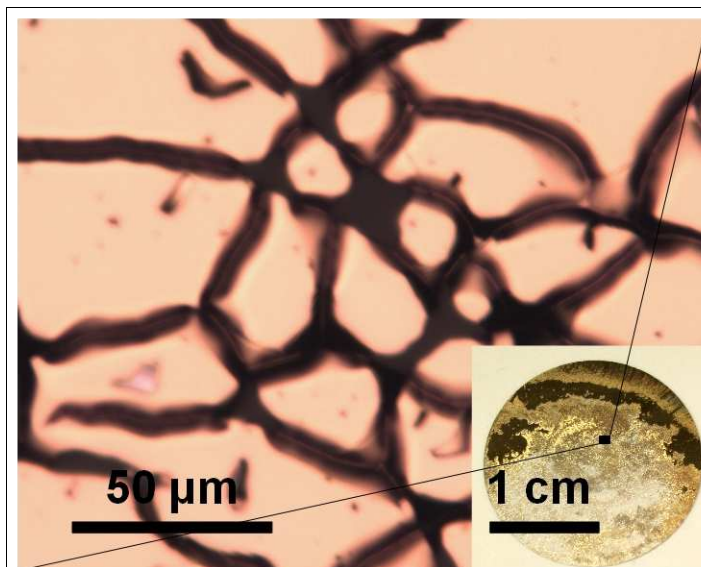
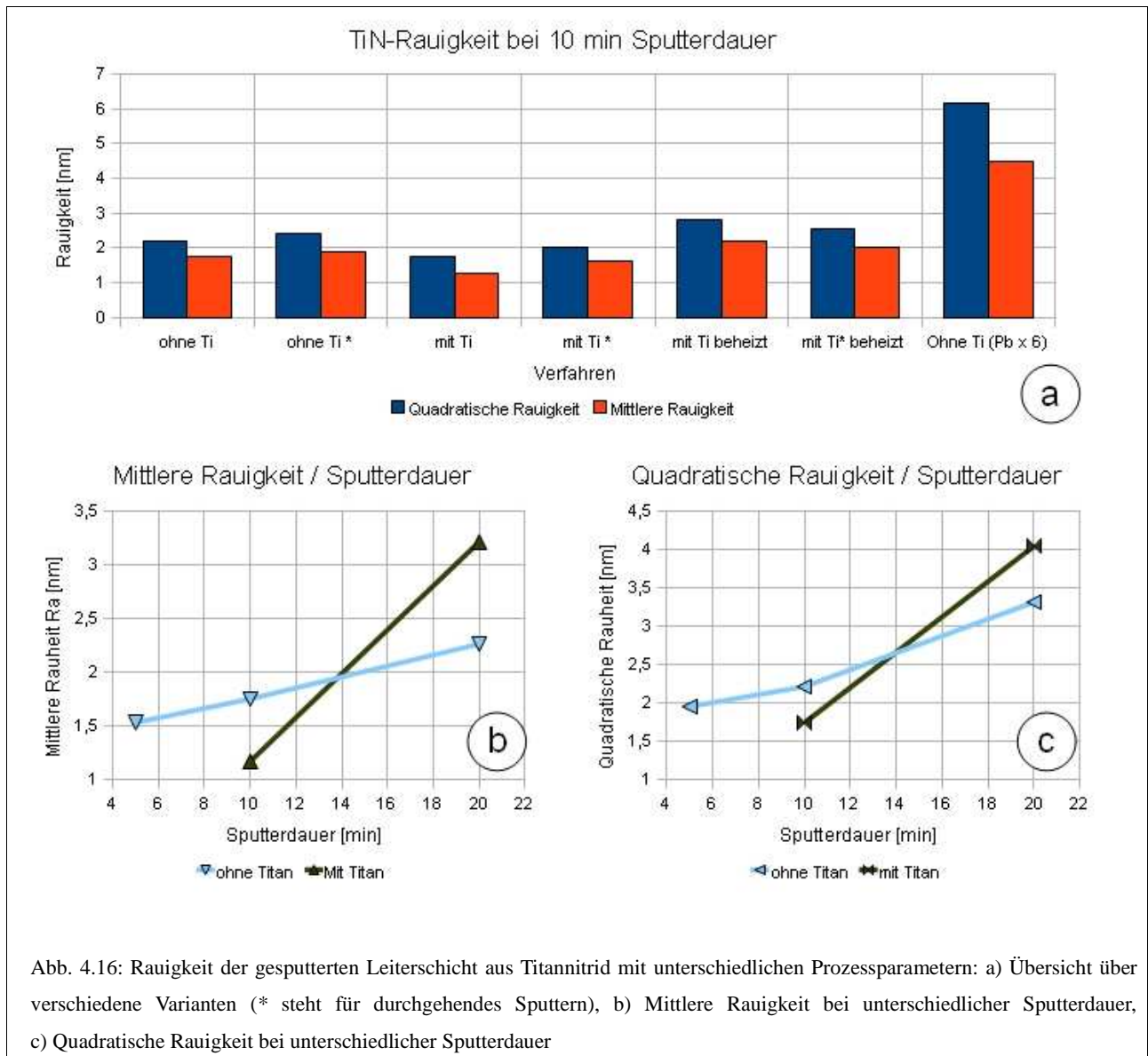


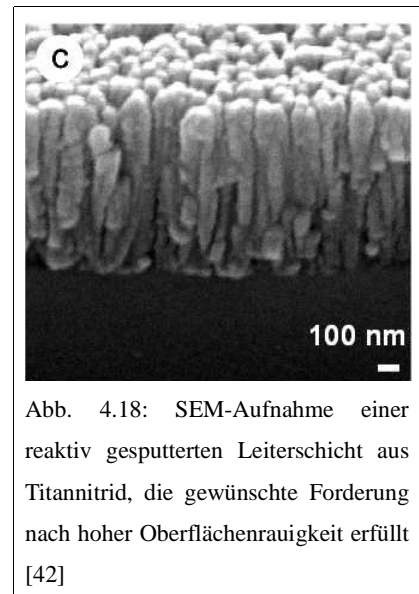
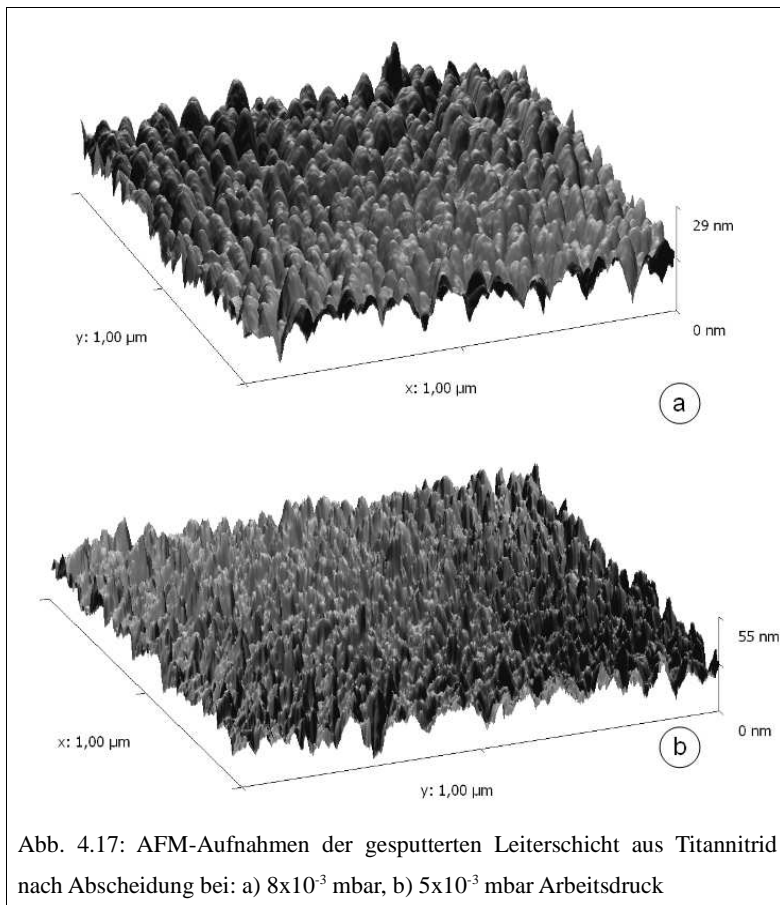
Abb. 4.15: Lichtmikroskopische Auflichtaufnahme von Rissen in der Leiterschicht aus Titannitrid bei zu hoher Schichtdicke. Die Einblendung rechts unten zeigt ein Foto des beschichteten Deckglases.

Titannitridschicht hängt von der durchgehenden Sputterdauer ab. Das Substrat wurde nach einer Minute Sputterdauer eine Minute lang abgekühlt, da das durchgehende Sputtern das Substrat erhitzt und somit eine veränderte Beschaffenheit der Oberfläche begünstigt. Die Auswirkungen eines durchgehenden Sputterprozesses sowie einer zusätzlichen Heizung des Substrats auf die Rauigkeit der abgeschiedenen Titannitridschicht wurden ebenfalls ermittelt. Durch zusätzlich heizen ließ sich die abgeschiedene Schichtdicke maximieren, denn aufgrund der Porösität des abgeschiedenen Materials bilden sich schon bei geringen Schichtdicken tiefe Risse (siehe

Abb. 4.15), die zu einem leichten Ablösen der gesamten Leiterschicht in Form von feinem Staub führen. Unter anderem deswegen erschien es zweckmäßig, die Auswirkungen einer Haftschicht aus Titan zu testen. Als besonders rauigkeitssteigernde Parameterveränderung wurde eine Erhöhung des Arbeitsdrucks durchgeführt. An der Farbe der abgeschiedenen Leiterschicht bei 6x höherem Arbeitsdruck ist erkennbar, dass sich damit auch die chemische Zusammensetzung der abgeschiedenen Titannitridschichten verändert [43]. Die Messungen der Rauigkeit wurden mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops (engl. Atomic force microscope; **AFM**) vorgenommen und sind in Abb. 4.16 in Diagrammform dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass zumindest der Effekt der Haftschicht aus Titan auf die Rauigkeit der Titannitridschicht von der Sputterdauer abhängt (siehe Abb. 4.16.b, c).



Eine genauere Betrachtung der abgeschiedenen Oberflächen zeigt schließlich, dass die gesteigerte Rauigkeit bei Druckerhöhung von der scharfkantigen Beschaffenheit der Titannitridschicht herrührt (siehe Abb. 4.17). Ein Vergleich mit einer Aufnahme, die mit einem-Raster-Elektronen-Mikroskop (engl. Scanning electron microscope; **SEM**) einer reaktiv gesputterten Titannitridschicht, die gewünschte Anforderungen erfüllt (siehe Abb. 4.18), zeigt, dass die Oberfläche nicht scharfkantig, sondern vielmehr hügelig sein sollte. Von allen variierten Parametern wurde der in Tabelle 4.2 gezeigte Parametersatz als der Geeignetste bestimmt. Der Wert für die resultierende Schichtdicke bezieht sich auf bestehende Tabellen ausgewerteter vorangehender Arbeiten. Diese Parameter wurden bei weiteren Versuchen verwendet.



Optimierte Parameter zu Vergütung der Elektroden					
<u>Arbeitsdruck</u>	<u>Sputterdauer</u>	<u>Leistung</u>	<u>Haftschicht</u>	<u>Beheizung</u>	<u>Schichtdicke</u>
8×10^{-3} mbar	20 x 60 s	50 W	Ja (Ti)	nein	~ 100 nm

Tab. 4.2: Optimierte Prozessparameter für die Oberflächenvergütung der Elektroden mit Titannitrid

4.2.2 Funktionalisierter Zellkulturkammerboden

Auf dem Kammerboden der Zellkulturkammer sollten Strukturen hergestellt werden, die ein gerichtetes Wachstum der Neuronen durch einen Kanal ermöglichen. Wie in Kap. 3.2.4 beschrieben, wird der Zellkulturkammerboden getrennt von der Zellkulturkammer durch lithographische Strukturierung prozessiert. Zu Beginn der Optimierung der Mikrostrukturierung des Zellkulturkammerbodens orientierten sich die Prozessparameter am Benutzerhandbuch des Herstellers [44] und wurden im Verlauf der Arbeit weiter verfeinert.

Um eine hohe Schichtdicke zu erreichen, wurde der Fotolack nicht verdünnt, weswegen er länger auf dem Trägersubstrat verteilt werden musste. Nach der Beschichtung mussten die Ränder und die Unterseite des Trägersubstrats gereinigt werden, damit dieses nicht beim anschließenden Softbake auf der Heizplatte kleben bleibt. Besonders kritisch ist nun das Anpressen der Lithographiemaske bei der Belichtung. Ein hoher Anpressdruck wurde

vermieden. Damit also die Lithographiemaske direkt auf dem Fotolack auflag und somit ein gutes Aspektverhältnis erreicht wurde, war es bei dicken Lackschichten umso entscheidender, dass die Oberfläche ausreichend eben ist. Dies konnte selbst nach einer halbstündigen Rotationsbeschichtung nur bedingt erreicht werden. Die Genauigkeit der Strukturierung hing somit auch von der gesamten Ausbreitung der Lackschicht ab. Beim Hardbake und der Entwicklung war wiederum darauf zu achten, dass die Lackreste vollständig entfernt wurden.

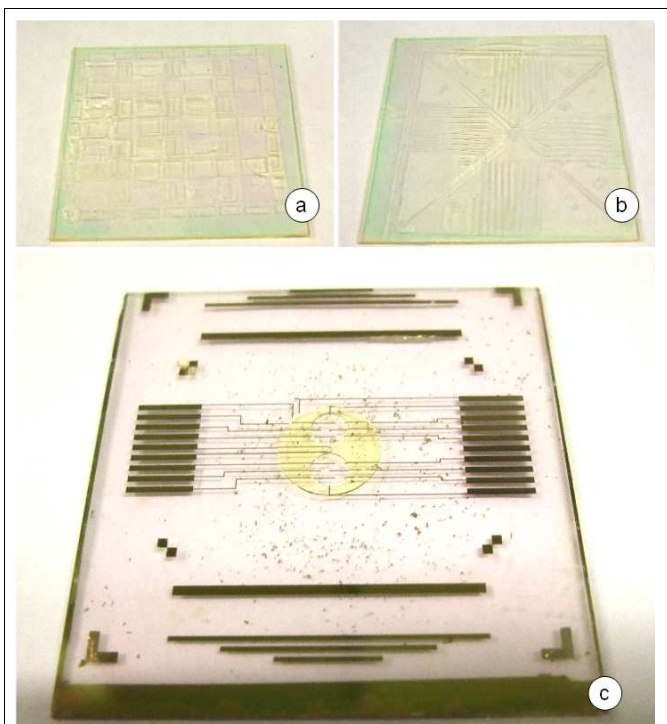


Abb. 4.19: Fotos von Trägersubstraten, die mit biokompatiblen Fotolack unterschiedlich strukturiert wurden: a) Lamellenstrukturen, b) Struktur der Leiterbahnen (nach Design 2), c) Mikrokanal auf MEA (nach Design 1)

Abb. 4.19 zeigt Fotos von strukturierten SU-8-Lackschichten auf Trägersubstraten. Die Prozessierung eines 300 μm breiten Mikrokanals (bei etwa gleicher Tiefe!) für das erste MEA-Design (siehe Abb. 4.19.c) war dabei noch unkritisch. Abb. 4.20 zeigt mikroskopische Aufnahmen des strukturierten SU-8-Lackschicht nach MEA-Design 1. Die Wände des Mikrokanals

und der beiden Vertiefungen im Zellkulturkammerboden fallen dabei über die gesamte Höhe der Lackschicht (300 μm) steil ab und sind an der Oberkante besonders scharf (siehe Abb. 4.20.c, d). Mit diesem Prozess lassen sich die Mikrokanäle auch über Elektroden platzieren, um den Signaldurchfluss durch den Mikrokanal zu messen (Siehe Abb. 4.20.a, b). Dabei soll der Kanal zwei Gebiete des kultivierten neuronalen Netzwerks topologisch trennen.

Um zu gewährleisten, dass die Zellkörper der Neuronen aufgrund ihrer Größe den Mikrokanal nicht passieren können und so die Neuriten topologisch von den Zellkörpern zu trennen, wird jedoch ein dünnerer Kanal benötigt. Im folgenden wurden zu diesem Zweck die mit diesem Prozess erreichbare Kanalbreite und der Mindestabstand zwischen den Mikrokanälen bestimmt.

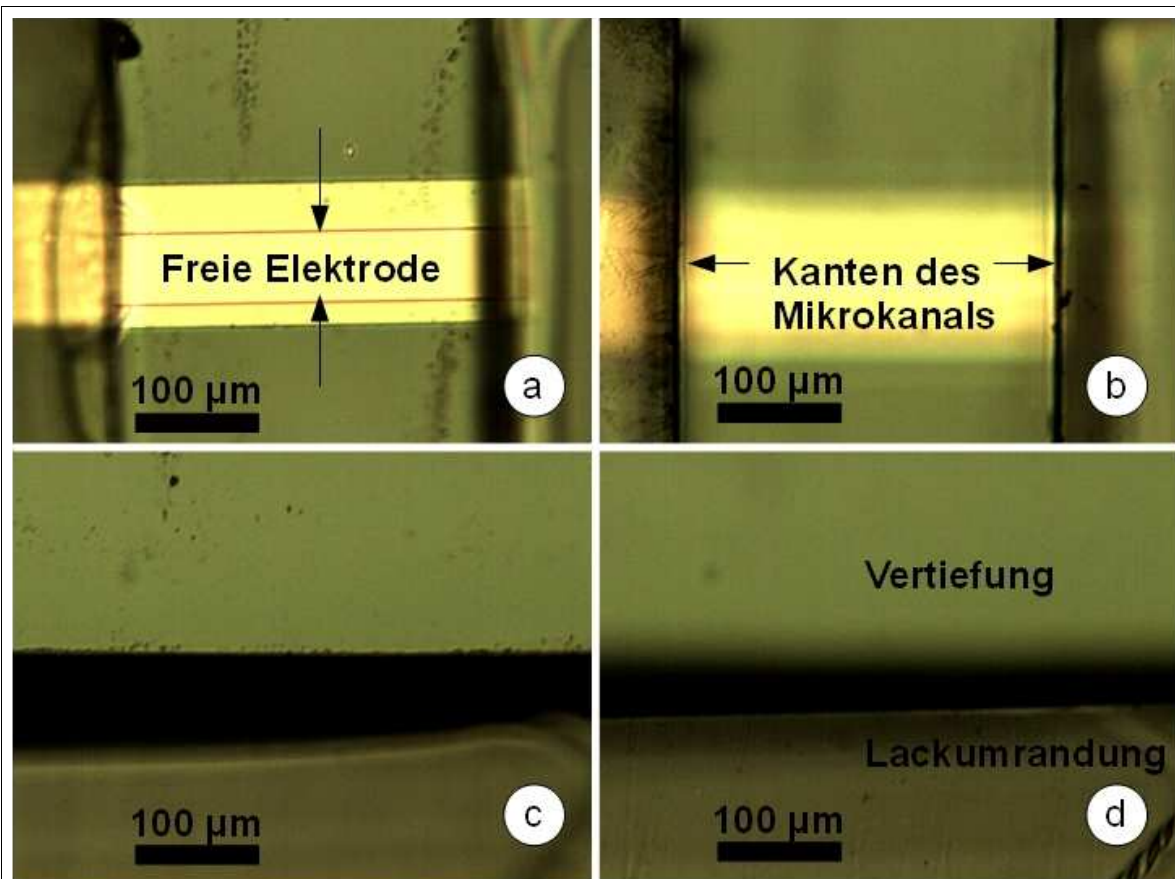


Abb. 4.20: Mikroskopische Aufnahmen des aus SU-8 Fotolack hergestellten Zellkulturkammerbodens: a), b) Mikrokanal über freigeätzter Elektrode, c), d) Rand der ringförmigen Vertiefung im Zellkulturkammerboden. In den Abbildungen links wurde jeweils auf die untere Kante fokussiert, in den Abbildungen rechts auf die Oberkante

Dafür wurden zwei Trägersubstrate komplett mit SU-8-Lack beschichtet und lithographisch strukturiert (siehe Abb. 4.19.a, b). Als Haftschicht für den Fotolack wurde jeweils Siliziumnitrid eingesetzt, da dies auch auf dem MEA den Untergrund für den Zellkulturkammerboden darstellt. Der Fotolack haftete gut auf dieser Oberfläche [45]. Lichtmikroskopische Aufnahmen der so hergestellten Kanalstrukturen in zwei Fokusebenen (Oberkante/Unterkante) sollen Aussagen über die in diesem Prozess erreichte Kantenschärfe, die minimale Kanalbreite und den Mindestabstand der Mikrokanäle zulassen. Dabei ist entscheidend, ob die Strukturen auf den Lithographiemasken abbildungsgetreu auf den Fotolack übertragen werden konnten.

In Abb. 4.21 sind prozessierte Mikrokanäle dargestellt. Es zeigt sich, dass die Kanten aller Mikrokanäle (von 10 – 100 µm Breite) ausreichend scharf sind. Die Wölbung des Lacks (siehe Abb. 4.21.b) spielt dabei eine nebensächliche Rolle, da der Abstand der Kanäle groß genug gewählt wurde. Abb. 4.22 zeigt prozessierte Mikrokanäle, die näher aneinander liegen. Die Prozessierung stieß bei einem Abstand der Mikrokanäle von unter 30 µm an ihre Grenzen. Bei kleinerem Abstand der Kanäle lösen sich die lamellenartigen Lackstrukturen vom Trägersubstrat (siehe Abb. 4.22.e). Dies sind vermutlich die Auswirkungen von Unterschneidungen im strukturierten Lack, welche durch längere Belichtung sowie optimierte Back- und Entwicklungsdauer vermindert werden können.

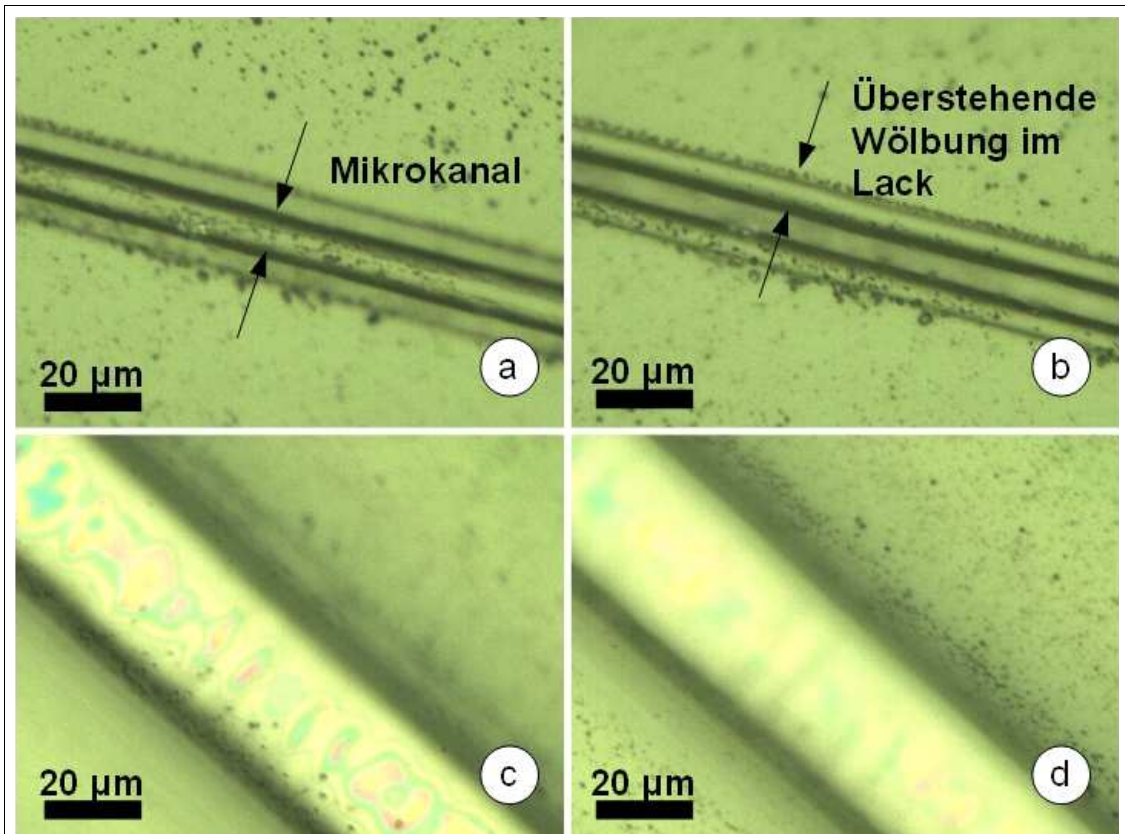


Abb. 4.21: Mikroskopische Aufnahmen von mit Hilfe der Lithographiemaske zur Strukturierung der Leiterbahnen (Design 2) prozessierten Mikrokanälen verschiedener Breite: a), b) 10 µm, c), d) 30 µm. In den Abbildungen links wurde jeweils auf die untere Kante fokussiert, in den Abbildungen rechts auf die Oberkante.

Das erreichte Aspektverhältnis von 300 : 20 ist dennoch bemerkenswert gut. In diesem Prozess ließen sich Anordnungen von mehreren 10 µm breiten, parallelen Mikrokanälen im Abstand von 30 µm herstellen (siehe Abb. 4.22.c, d). Dies müsste ausreichen, um Axone der darauf kultivierten Neuronen zu isolieren und mit darunter gelegenen Elektroden gezielt axonale Signale abzuleiten. Tabelle 4.3 zeigt die verwendeten Parameter.

Optimierte Parameter zur Fertigung eines funktionalisierten Zellkulturkammerbodens					
<u>Dispense</u>	<u>Spin</u>	<u>Softbake</u>	<u>Belichten</u>	<u>Hardbake</u>	<u>Entwickeln</u>
300 rpm / 180 s	3000 rpm / 720 s	95 °C / 35 Min.	9 s	95 °C / 15 Min.	25 Min.

Tab. 4.3: Verwendete Parameter zur Prozessierung von Mikrokanälen als funktionalisierter Zellkulturkammerboden

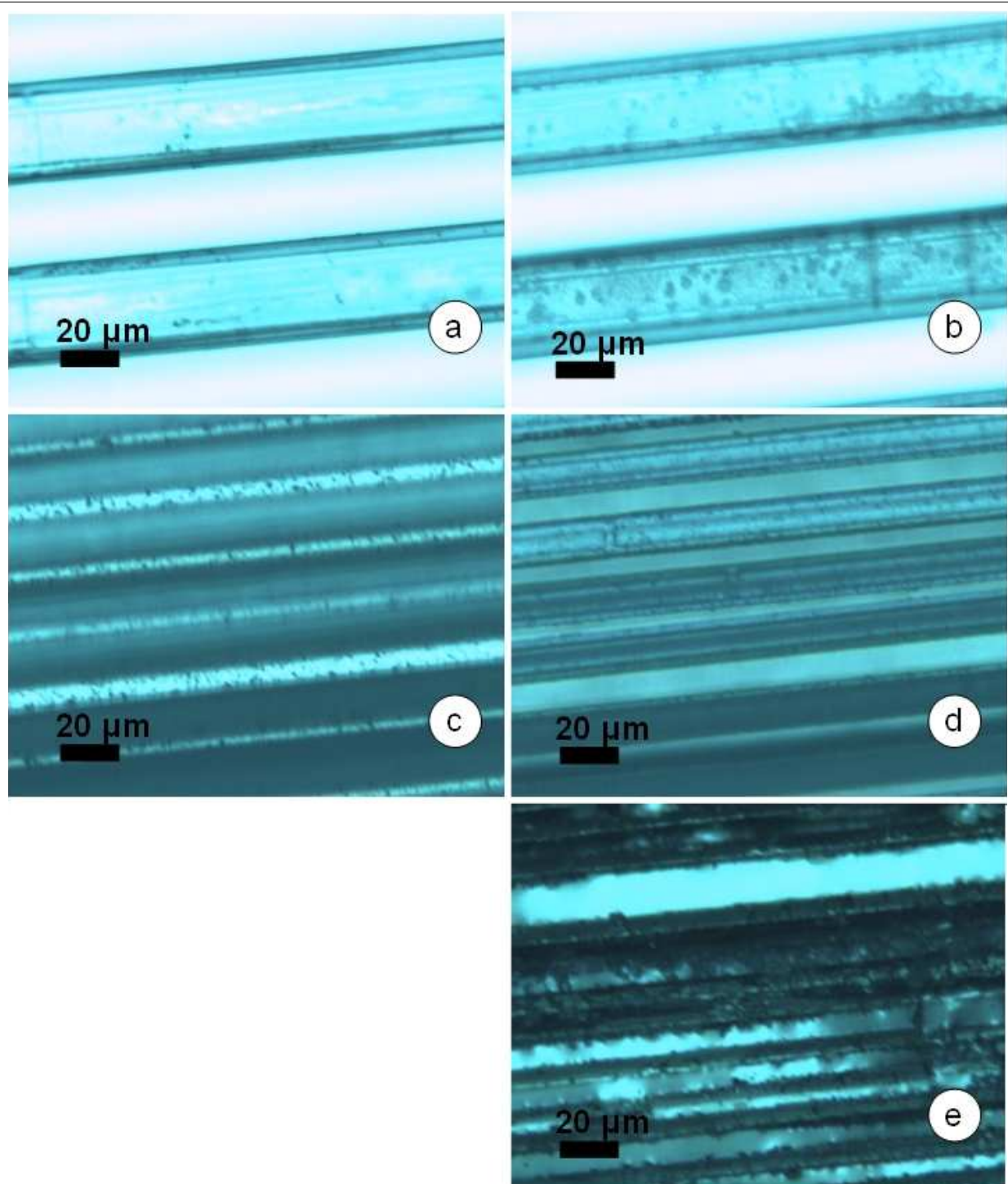


Abb. 4.22: Mikroskopische Aufnahmen von mit Hilfe der Lithographiemaske zur Strukturierung von Lamellen prozessierten Mikrokanälen verschiedenen Abstands: a), b) 30 μm , c), d), e) 20 μm . In den Abbildungen links wurde jeweils auf die untere Kante fokussiert, in den Abbildungen rechts auf die Oberkante.

4.2.3 Zellkulturkammern

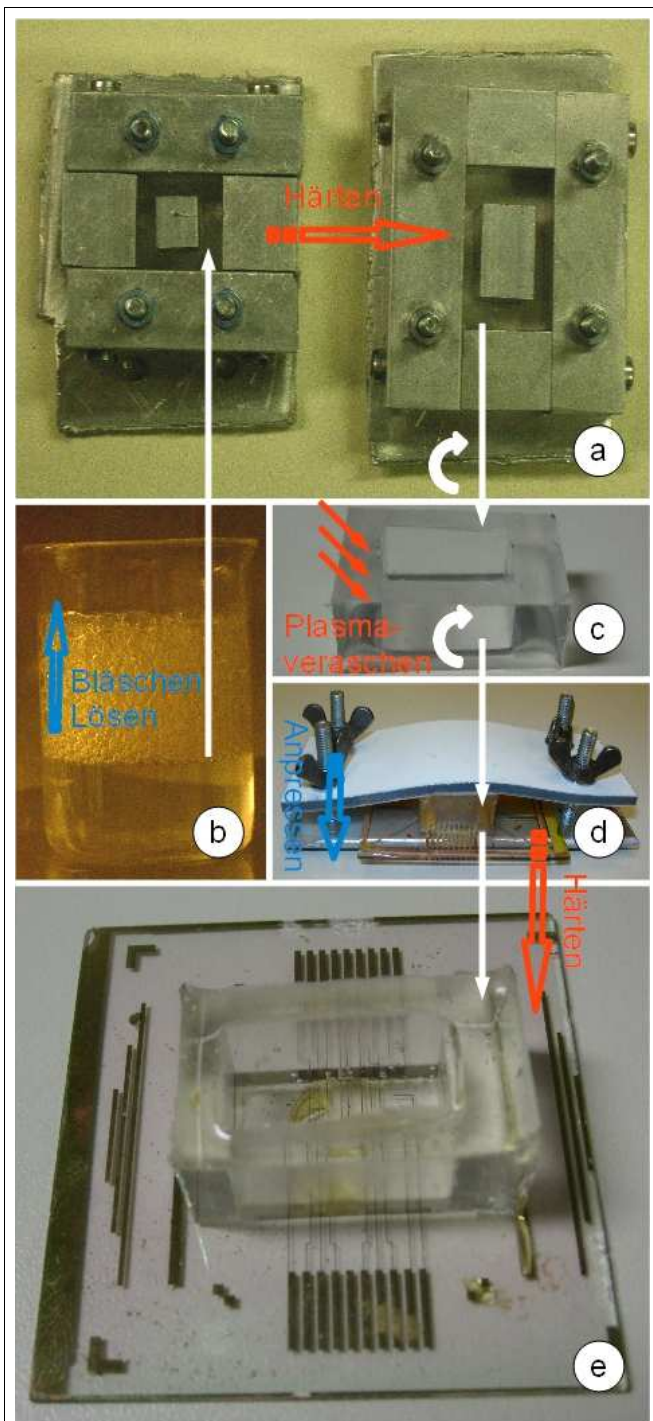


Abb. 4.23: Fertigung der Zellkulturkammern: a) angefertigte Gussformen, b) Flüssiger Silikonkautschuk mit Luftbläschen in der Vakuumkammer, c) gehärtete Zellkulturkammer, d) Anpressen der Zellkulturkammer auf dem Biochip, e) fertiger Biochip

Um mit Hilfe der prozessierten MEAs neuronale Aktivität ableiten zu können, ist es notwendig, eine Zellkulturkammer auf dem MEA aufzubringen, die das Nährmedium aufnehmen kann. Erst so wird eine Zellkultivierung auf dem Biochip zu möglich.

Für die Produktion der Zellkulturkammern musste zuerst eine Gussform (siehe Abb. 4.23.a) angefertigt werden. In diese Gußform wurde der Silikonkautschuk nach Zusammenmischen der beiden Komponenten und anschließender Entfernung der dabei entstandenen Luftbläschen in der Vakuumkammer (siehe Abb. 4.23.b) gefüllt. Dabei scheiterte ein erstes Modell daran, dass als Bodenplatte eine Polyacrylplatte verwendet wurde. Polyacryl hat einen anderen Ausdehnungskoeffizienten als Aluminium, was beim Härten bei 120°C durch Verspannungen zum Ausfließen des sich verfestigenden Silikonkautschuks führt. Mit einer geschliffenen Bodenplatte aus Aluminium ließ sich der Silikonkautschuk jedenfalls einwandfrei so formen, dass er später auch auf dem Biochip haftete (siehe Abb. 4.23.e). Die fertige Zellkulturkammer ist in Abb. 4.23.c zur genaueren Betrachtung mit der glatten Kontaktfläche, welche durch Plasmaveraschen hydrophilisiert wurde, um die Haftung am Biochip zu verbessern, nach oben gerichtet. Der Anpressdruck beim Backen wurde über mit Gewindestangen verbundenen Polyacrylplatten erreicht (siehe Abb. 4.23.d). Die Haftung auf der Isolationsschicht war sehr gut, und die Zellkulturkammer war auch nach Wochen noch absolut wasserdicht. Die Herstellung der Zellkulturkammer (siehe Kap. 3.2.4) sowie das Anhaften der Zellkulturkammer auf dem Chip nach

den in Kap.3.2.5 beschriebenen Parametern war somit erfolgreich. Die Pfeile in Abb. 4.23 sollen den zeitlichen Ablauf der Herstellung der Zellkulturkammer verdeutlichen.

4.3 Kalibrierung des Messsystems

Es wurde ein modulares Messsystem zur Ableitung und Aufzeichnung von elektrischen Signalen vom hergestellten Biochip aufgebaut. Anschließend wurde eine Eignung der unterschiedlichen Komponenten für die Messung untersucht. Zunächst wurde eine geeignete Beschaltung des Verstärkers ermittelt (siehe Kap. 4.3.1) und das Verhalten des Signalgenerators unter Belastung (siehe Kap. 4.3.2) sowie die zeitliche Auflösung der Datenkarte (siehe Kap. 4.3.3) untersucht. Anschließend wurde die Funktion der Verstärkerplatinen überprüft (siehe Kap. 4.3.4). Außerdem wurde ein geeigneter Verstärkungsfaktor bestimmt (siehe Kap. 4.3.5) und die zweistufige Verstärkerschaltung mit einer einstufigen Verstärkerschaltung verglichen (siehe Kap. 4.3.6).

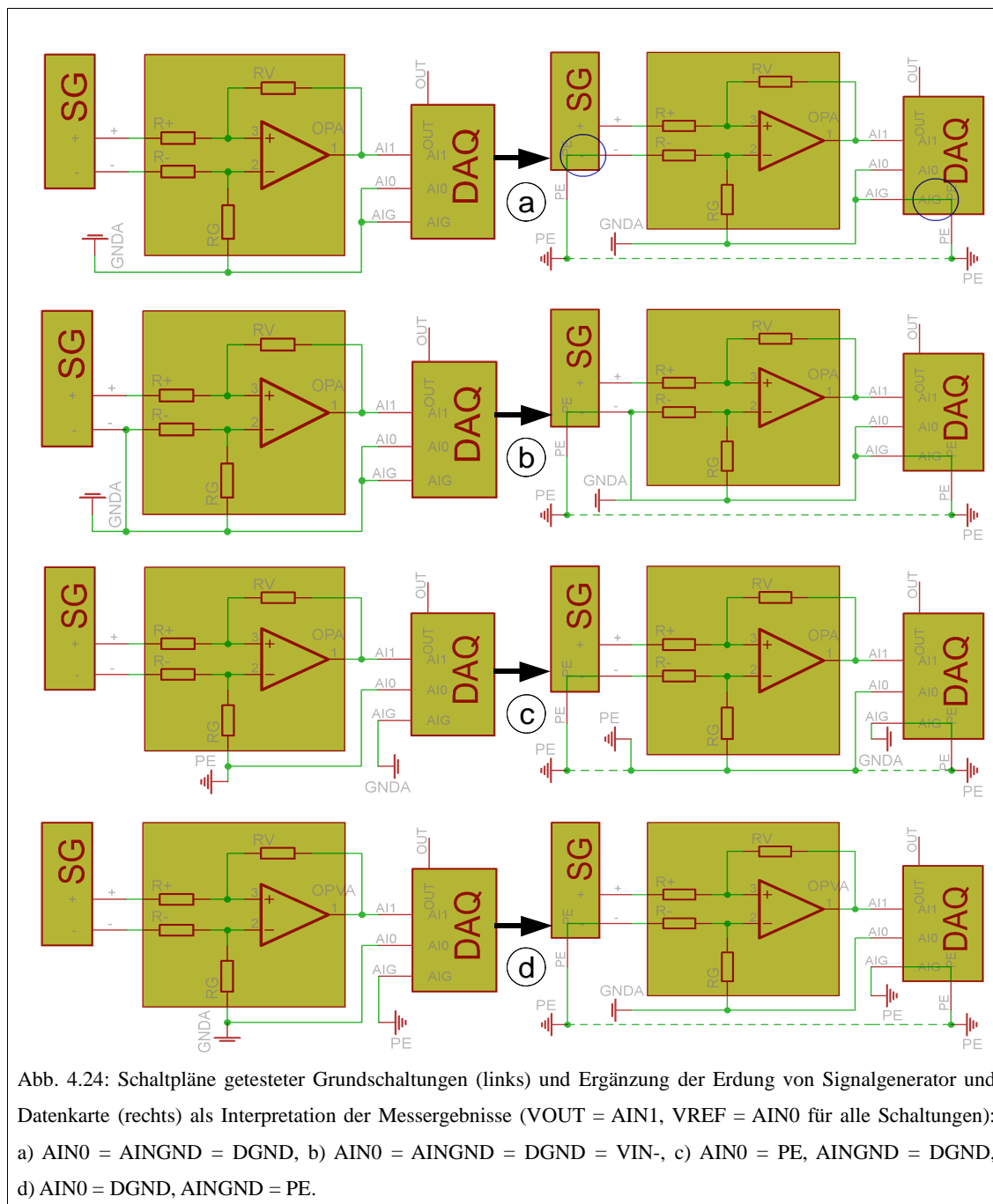
4.3.1 Funktionstests Grundschtaltung

Um die OPVs auf den Verstärkerplatinen sachgemäß zu verlöten, wurden Funktionstests an der Grundschtaltung durchgeführt. Die Grundschtaltung umfasst die Datenkarte, den Signalgenerator und natürlich einen OPV, wobei es für den Verstärker unterschiedliche Anschlusskonfigurationen gibt. Es wurden verschiedenste Messkonfigurationen verglichen, wobei die korrekte Beschaltung der Masse im Vordergrund lag.

In Abb. 4.24 links sind 4 der getesteten Schaltungen abgebildet. Dabei wurden die Anschlüsse für die Versorgungsspannung zur besseren Übersicht weggelassen. In allen gezeigten Messkonfigurationen wurde ein Eingang der Datenkarte (AIN1) fix mit dem Ausgang eines OPVs (VOUT) verbunden, an dessen Eingänge (Vin+, Vin-) wiederum die Ausgänge des Signalgenerators (SG+, SG-) angeschlossen sind. Ein weiterer Eingang (AIN0) wurde mit dem Anschluss für das Bezugspotential des Verstärkers (VREF) verbunden. Außerdem wurde dieser Eingang (AIN0) sowie der Masseanschluss der Datenkarte (AINGND) je nach Konfiguration an eine von zwei getrennten Massen angeschlossen. Zum Vergleich wurde der Massepunkt zwischen den zwei in Serie geschalteten Stromquellen (engl. ground; **DGND**, **GND**A) und die Erdung der Stromquellen (engl. protective earth; **PE**) verwendet.

Im weiteren wurden bei jeder Messkonfiguration zwei Methoden der Datenerfassung verglichen. Dabei bezieht sich die von der Datenkarte gemessene Spannung an den analogen Eingängen entweder auf eine einzige fixe Bezugsmasse (AINGND) oder aber auf andere Eingänge wie z.B. AIN0. Für jede getestete Messkonfiguration konnte so das verstärkte Signal des Signalgenerators am Ausgang des Verstärkers gleichzeitig in Bezug zu zwei unterschiedlichen Massen (DGND oder PE) gemessen werden, wobei zu beachten ist, welche davon als Bezugspotential für den Verstärker ($V_{REF} = AIN0$) eingesetzt wird. Für den Vergleich der Schaltungen wurde ein Rechteckssignal mit einer Amplitude von 50 mV und einer Frequenz von 2 Hz generiert und zehnfach verstärkt.

Die Messergebnisse sind in Abb. 4.25 zu sehen. Dabei zeigt sich, dass das von der Datenkarte erfasste Signal in allen Konfigurationen schärfer ist, wenn es in Bezug zu AIN0 (rot dargestellt) gemessen wurde. Für Konfigurationen mit zwei getrennten Massen (siehe Abb.4.23.c, d) ergibt sich dies aus der Funktionsweise des Verstärkers, da ja AIN0 stets mit dem Bezugspotential des Verstärkers (V_{REF}) verbunden war. Allerdings war dieser Effekt auch in Messkonfigurationen zu sehen, in denen eine gemeinsame Masse angeschlossen wurde (siehe Abb. 4.25.a). Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass es einen erheblichen Unterschied machte, welche Masse wo angeschlossen wurde.



In Abb. 4.25.e ist der Spannungsverlauf am Verstärkerausgang in Bezug zur vom Verstärker isolierten Erdung dargestellt. Deutlich zu sehen sind der Einfluss des Netzbrumms (50 Hz Sinus) sowie eine konstante Offsetspannung von 4,3 V. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da ja das Bezugspotential des Verstärkers auf eine von der Datenkarte getrennte Masse gelegt wurde. Allerdings wäre bei umgekehrter Beschaltung der Masse ein ähnliches Ergebnis zu erwarten, was jedoch nicht der Fall war (siehe Abb. 4.25.c).

In einer weiteren Messkonfiguration wurde eine gemeinsame Masse verwendet, die ebenfalls mit dem invertierenden Eingang des Verstärkers (V_{in-}) verbunden wurde (siehe Abb. 4.24.b). Dies ist grundsätzlich bei einem Instrumentenverstärker nicht notwendig, aber durchaus gebräuchlich. Es zeigt sich jedoch, dass die erfassten Signale in dieser Messkonfiguration von einem stärkeren Rauschen begleitet wurden (siehe Abb. 4.25.b), als ohne die

Verbindung von invertierendem Eingang und Masse (siehe Abb. 4.25.a).

Die Ergebnisse geben Anlass zur Vermutung, dass der Masseanschluss der Datenkarte (AINGND) wie auch ein Anschluss des Signalgenerators (SG-) über den Stromanschluss bereits geerdet sind. In Abb. 4.24 rechts sind die entsprechenden Schaltpläne dargestellt. Falls die Vermutung zutrifft, kommt es zu Masseschleifen, welche das beobachtete Rauschverhalten erklären könnten. Diese einfache Annahme und deren Auswirkungen werden in Kap. 4.4.1 noch detaillierter analysiert. Als Konfiguration mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis erweist sich eine gemeinsame Masse, die nicht mit dem invertierenden Eingang verbunden ist, wobei beide Messmethoden annähernd des gleiche Ergebnis liefern (siehe Abb. 4.25.a). Für weitere Messungen wurde diese Messkonfiguration (siehe Abb. 4.24.a) eingesetzt. Insbesondere die Verstärkerplatinen wurden nach diesem Schema verkabelt.

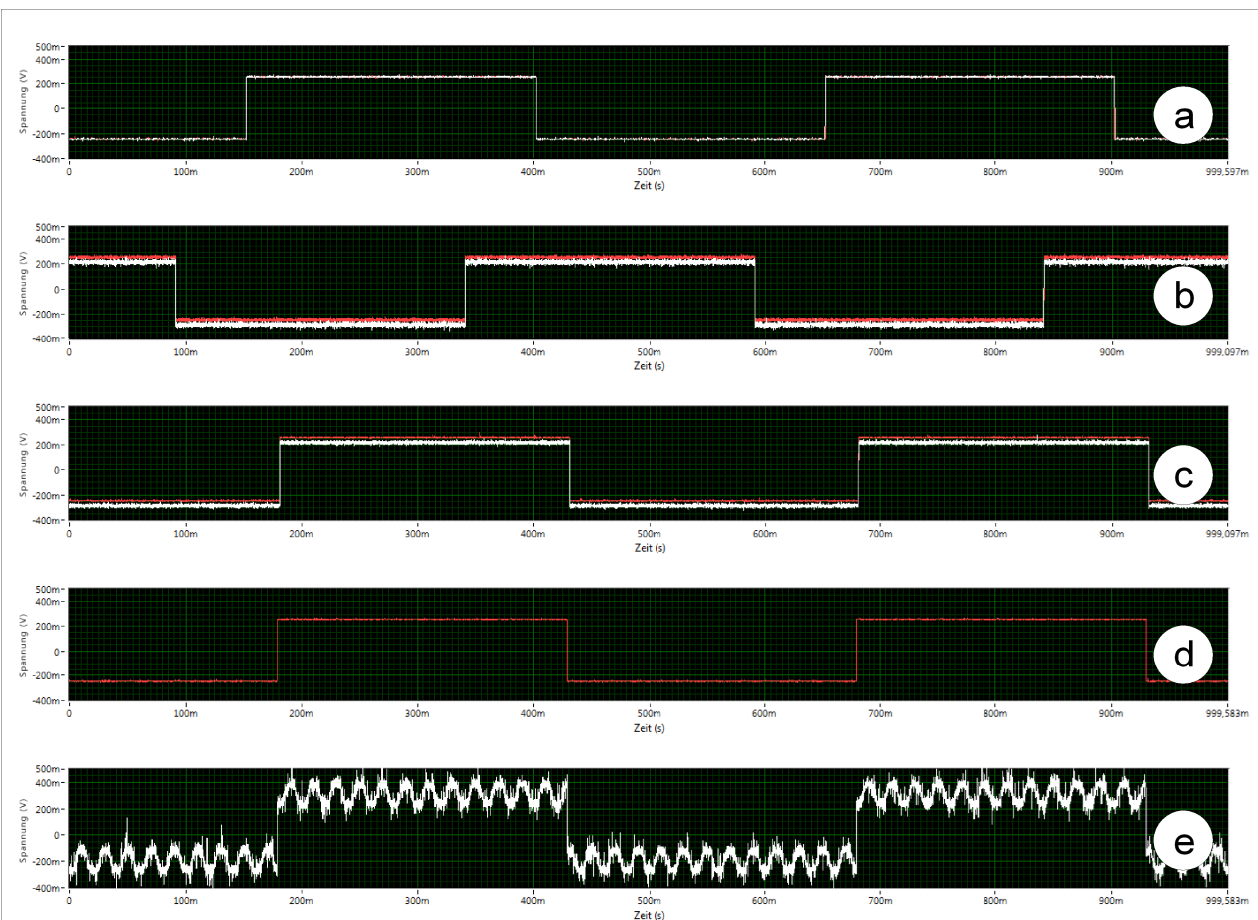


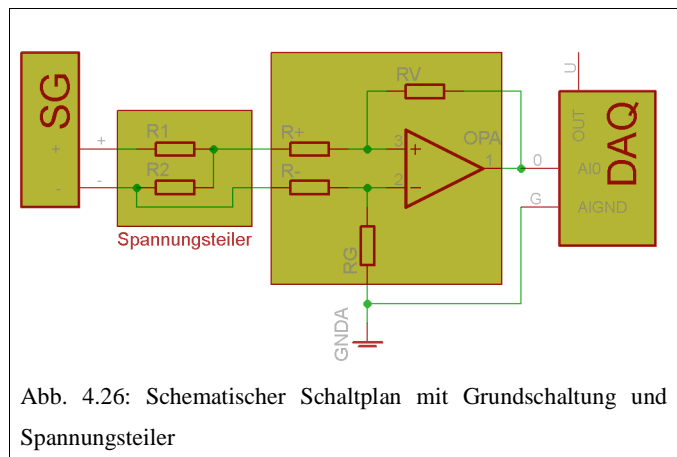
Abb. 4.25: Aufzeichnungen der Funktionstests der Grundschiung, zehnfach verstärkt. In rot ist jeweils die Spannung zwischen AIN1 (= VOUT) und AIN0 (= VREF), in weiß die Spannung zwischen AIN1 und AINGND dargestellt. Die Messkonfigurationen wurden gemäß den in Abb. 3.23 gezeigten Schaltplänen gewählt: a) AIN0 = AINGND = DGND, b) AIN0 = AINGND = DGND = VIN-, c) AIN0 = PE, AINGND = DGND, d) , e) AIN0 = DGND, AINGND = PE.

4.3.2 Signalgenerierung unter Belastung

Da jede Stromquelle wie auch der Signalgenerator einen Innenwiderstand (R_i) besitzt, hängt der tatsächliche Spannungsabfall an einem angeschlossenen Verbraucher (U_L) gemäß $U_L/U_G = R_L/(R_L+R_i)$ von der generierten Gesamtspannung (U_G) sowie vom Lastwiderstand (R_L) ab. Deshalb kann am Signalgenerator der angeschlossene Lastwiderstand eingestellt werden ($U_L = 20\ \Omega$ – unendlich). Daraus errechnet der Signalgenerator die für einen einstellbaren gewünschten Spannungsabfall am Lastwiderstand (U_L) nötige Gesamtspannung U_G . Der Innenwiderstand des verwendeten Signalgenerators (R_i) beträgt $20\ \Omega$. Im Grenzfall $R_L \rightarrow 20\ \Omega$ gilt deswegen $U_L = U_G/2$ und im Grenzfall $R_L \rightarrow \text{unendlich}$ gilt $U_L = U_G$.

Eine Messung an verschiedenen aus einzelnen Widerständen aufgebauten Spannungsteilern am Signalgenerator gemäß dem Schaltplan in Abb. 4.26 mit als

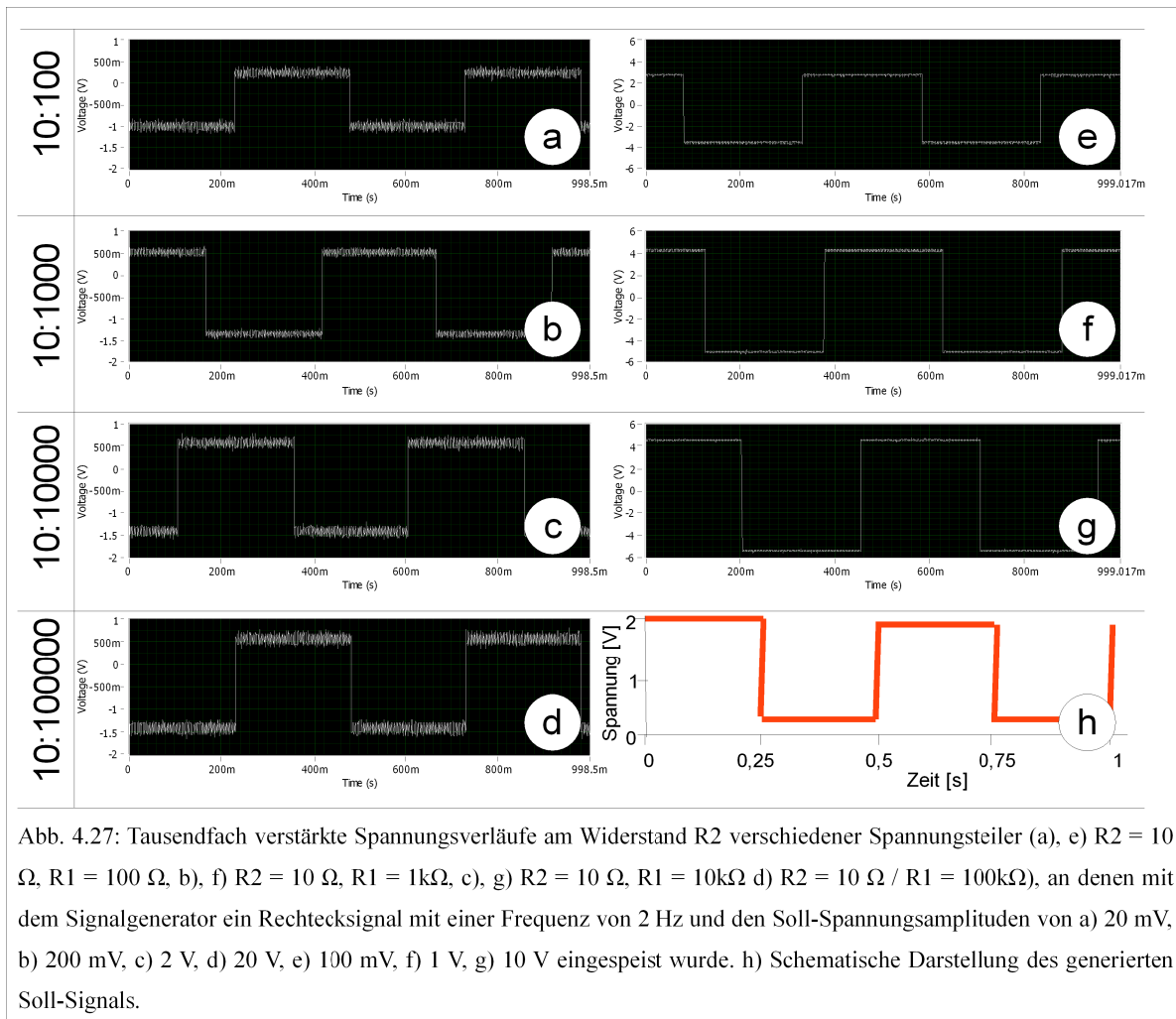
unendlich angenommenem Lastwiderstand, zeigt den Verlauf der abfallenden Spannung in Abhängigkeit vom Gesamtwiderstand und vom Teilungs-Verstärkungs-Verhältnis (siehe Abb. 4.27). Da der Signalgenerator nicht auf den Lastwiderstand angepasst wurde, kommt es zu einer Abweichung der aus reiner Multiplikation des Teilungs-Verstärkungs-Verhältnisses mit dem am Signalgenerator eingestellten Soll-Spannung am Lastwiderstand (siehe Abb. 4.27.a, b). Diese



Abweichung wird bei Lastwiderständen größer als $1\ \text{k}\Omega$ unter Annahme eines unendlich großen Widerstands kleiner als ein Prozent (siehe Abb. 4.27.f, g).

Des weiteren ist zu sehen, dass die Amplitude des aufgezeichneten Rauschens abhängig von der Konfiguration der Spannungsteiler sowie von der generierten Signalthöhe $200 - 300\ \text{mV}$ betrug. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei den gezeigten Signalen um tausendfach verstärkte Spannungsunterschiede handelt, womit auch Störsignale an den Verstärkereingängen tausendmal verstärkt werden. Dem aufgezeichneten Rauschen entspricht also ein Rauschen an den Verstärkereingängen von rund $300\ \mu\text{V}$. Der starke Einfluss der Unschärfe des vom Signalgenerator erzeugten Signals wurde im Vergleich mit einer anderen Signalquelle besonders deutlich (siehe Kap. 4.3.5 und 4.3.6).

Die Versuche zeigen, dass nur bei kleinen Lastwiderständen ($< 1\ \text{k}\Omega$) ein zusätzliches Spannungsmessgerät eingesetzt werden muss, das den tatsächlichen Spannungsabfall am Lastwiderstand misst. Ob der Signalgenerator geeignet ist, um damit Neuronen zu stimulieren, soll in weiteren Versuchen untersucht werden (siehe Kap. 4.6.3). Aufgrund des relativ hohen Rauschens wurde jedoch für die Messung des Signal-Rausch-Verhältnisses des Messaufbaus ein Biosignalsimulator von Microchannel Systems eingesetzt (siehe Kap.3.5.3), welcher im Bereich von $100\ \mu\text{V}$ wesentlich schärfere Signale generiert.



4.3.3 Zeitliche Auflösung der Datenerfassung

Die Aktionsimpulse der neuronalen Aktivität sollten in diskreten Messpunkten erfasst werden (siehe Kap. 3.5.3). Dazu wurde die Eignung der Datenkarte NI USB 6211 bestimmt, wobei als entscheidendes Kriterium das zeitliche Auflösungsvermögen herangezogen wurde. Dabei muss nach dem (für praktische Anwendungen modifizierten) Nyquist-Theorem [36] die Abtastrate mindestens 2,2 Mal höher sein als die maximale aufzulösende Frequenz. Bei einer Mehrkanaldatenerfassung hängt die Abtastrate von der Anzahl der simultan gemessenen Kanäle ab. Bei 8 Kanälen und einer Gesamtabtastrate von 250 kS/s entspricht dies einer Abtastrate von 30 kS/s pro Kanal, womit bis zu 70 μs breite Pulse aufgelöst werden können sollten. Dieses Theorem wurde durch die Messung bestätigt.

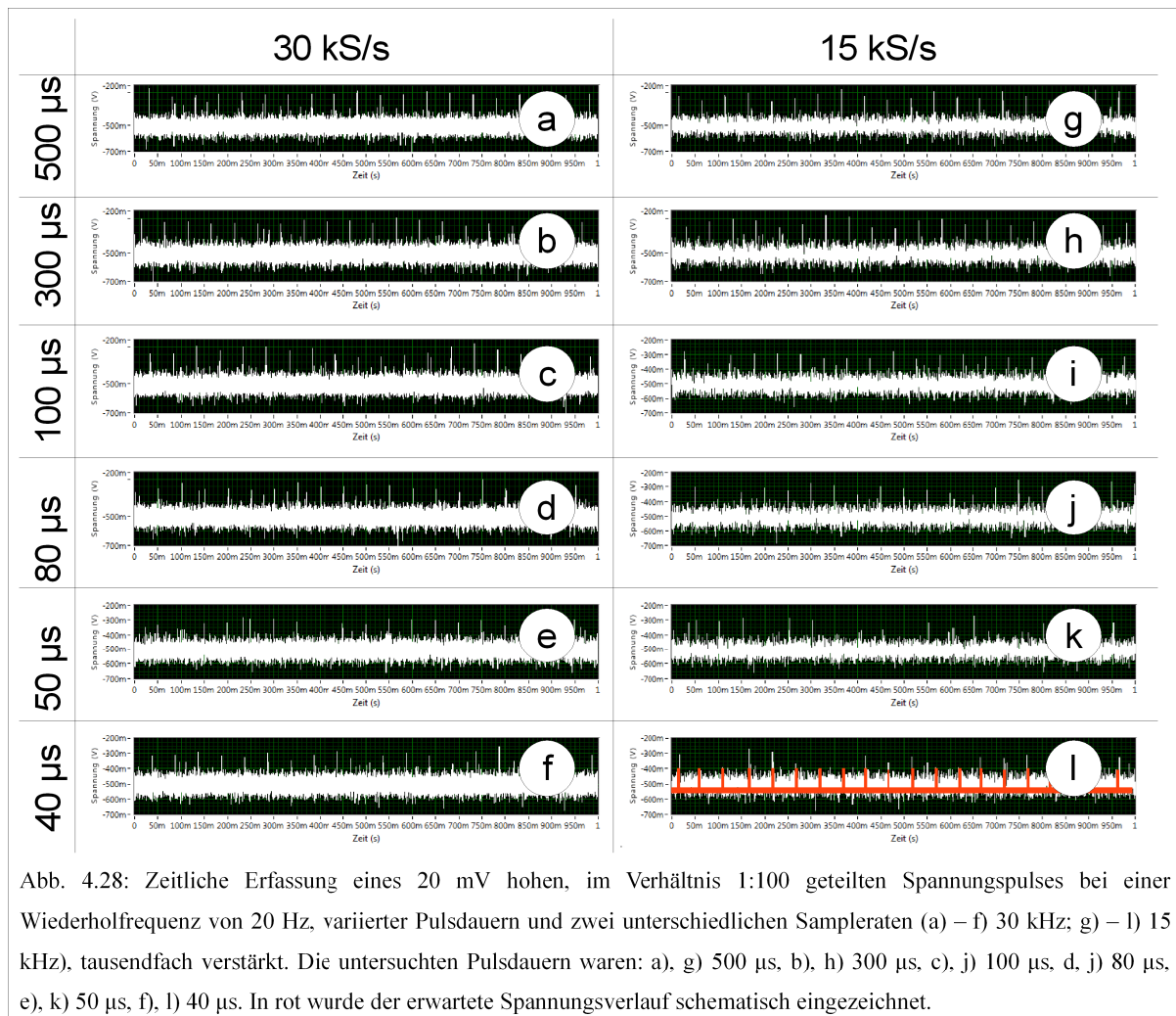
Dazu wurde aus dem Signalgenerator, der Datenkarte, einem Spannungsteiler ($10 \Omega : 1 \text{ k}\Omega$) und ein Verstärker (Faktor x1000) der in Abb. 4.26 zu sehende Schaltplan nachgestellt. Anschließend wurden mit dem Signalgenerator scharfe Pulse von 40 – 500 μs Dauer erzeugt, die bereits geteilt und verstärkt mit der Datenkarte zum Vergleich mit zwei unterschiedlichen Samplerraten (15 kS/s / 30 kS/s) digitalisiert wurden. Entscheidend ist nun, ob nach der Datenerfassung noch alle Pulse vom Rauschen unterschieden werden konnten. Dazu wurden die Signale über eine Dauer von einer Sekunde aufgezeichnet.

Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abb. 4.28 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass sich die erfassten

Spannungspulse bei einer Pulsdauer von 300 μs oder größer (siehe Abb. 4.28.a, b, g, h) noch deutlich vom Rauschen abheben. Bei einer Samplerate von 15 kHz konnten bereits bei einer Pulsdauer von 100 μs nicht mehr alle Pulse einwandfrei identifiziert werden (siehe Abb. 4.28.j). Dasselbe gilt für die verwendete Samplerate von 30 kHz bei einer Pulsdauer von 50 μs (siehe Abb. 3.26.e). Noch kürzere Pulsdauern können nur sehr unzuverlässig erfasst werden, da auf den einzelnen Impulsen nur noch wenige bis gar keine Messpunkte liegen (siehe Abb. 4.28.f, k, l).

Die Versuche zeigen, dass die Erfassung eines Signals mit einer Pulsdauer von einer Millisekunde oder länger mit der NI USB 6211 ohne weiteres möglich ist, solange sich die Amplitude des Signals stark genug vom Rauschen unterscheidet. Das Signal-Rausch-Verhältnis wird in weiteren Messungen noch näher behandelt (siehe Kap. 4.3.5 und 4.3.6).

Erwähnt sei an dieser Stelle noch, dass ein Vergleich zwischen Oszillator (analoge Messung) und Datenkarte (digitalisierte Messung) vernachlässigbare Unterschiede aufweist, solange die Frequenz unter der Auflösungsgrenze von 14 kHz liegt.



4.3.4 Mehrkanalverstärkerschaltung

Um die Funktion der angefertigten Verstärkerplatten zu überprüfen, wurden alle Kanäle gemäß dem Schaltplan in Abb. 4.29 zusammengeschaltet und über einen Spannungsteiler ($10\ \Omega : 1\ \text{k}\Omega$) dasselbe Rechtecksignal (Amplitude = 20 mV, Frequenz = 2 Hz) gleichzeitig an allen Verstärkern angelegt. Nun sollte bestimmt werden, ob alle Kanäle gleichermaßen verstärkt werden. Dafür soll der Verstärkungsfaktor und das erzielte Signal-Rausch-Verhältnis untersucht werden.

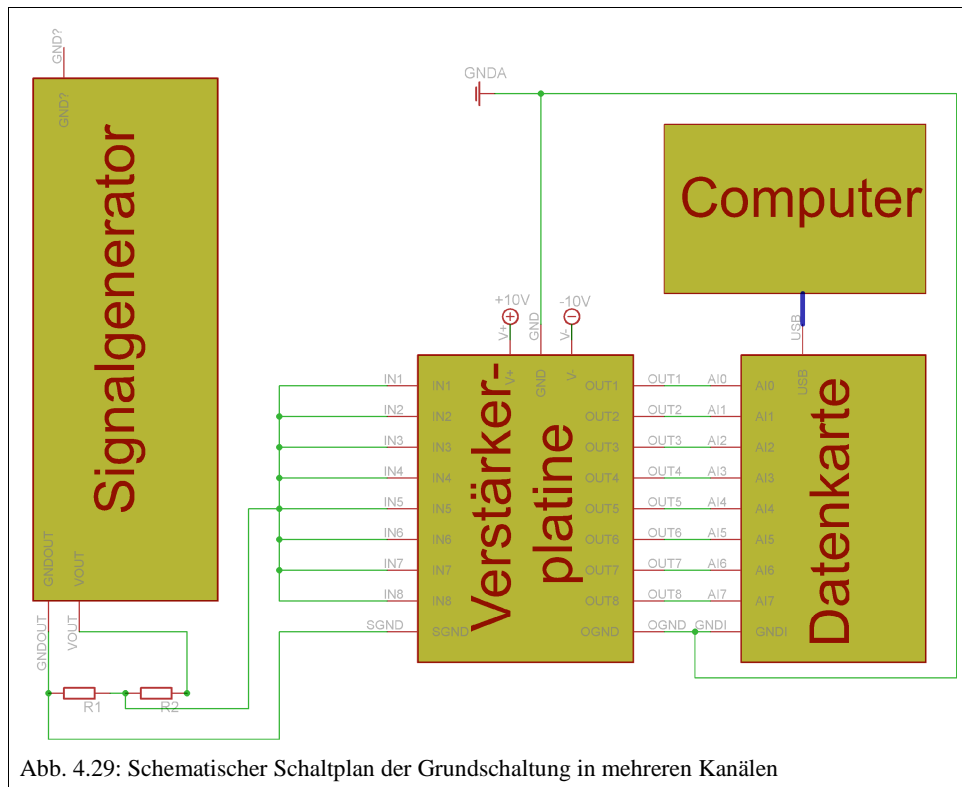
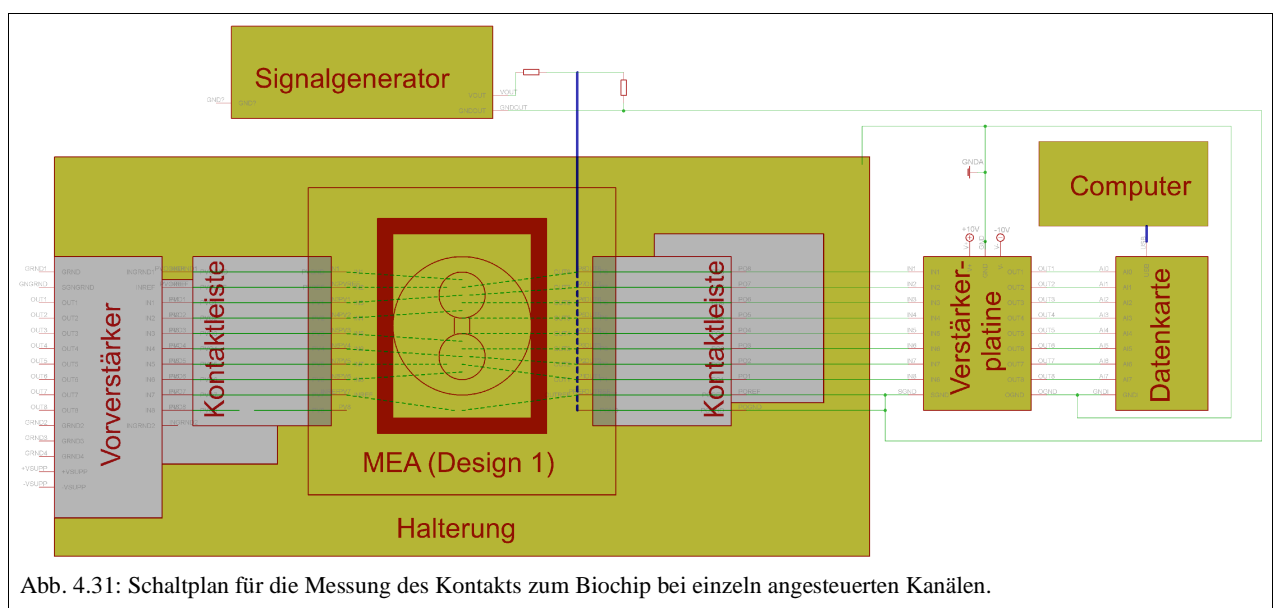
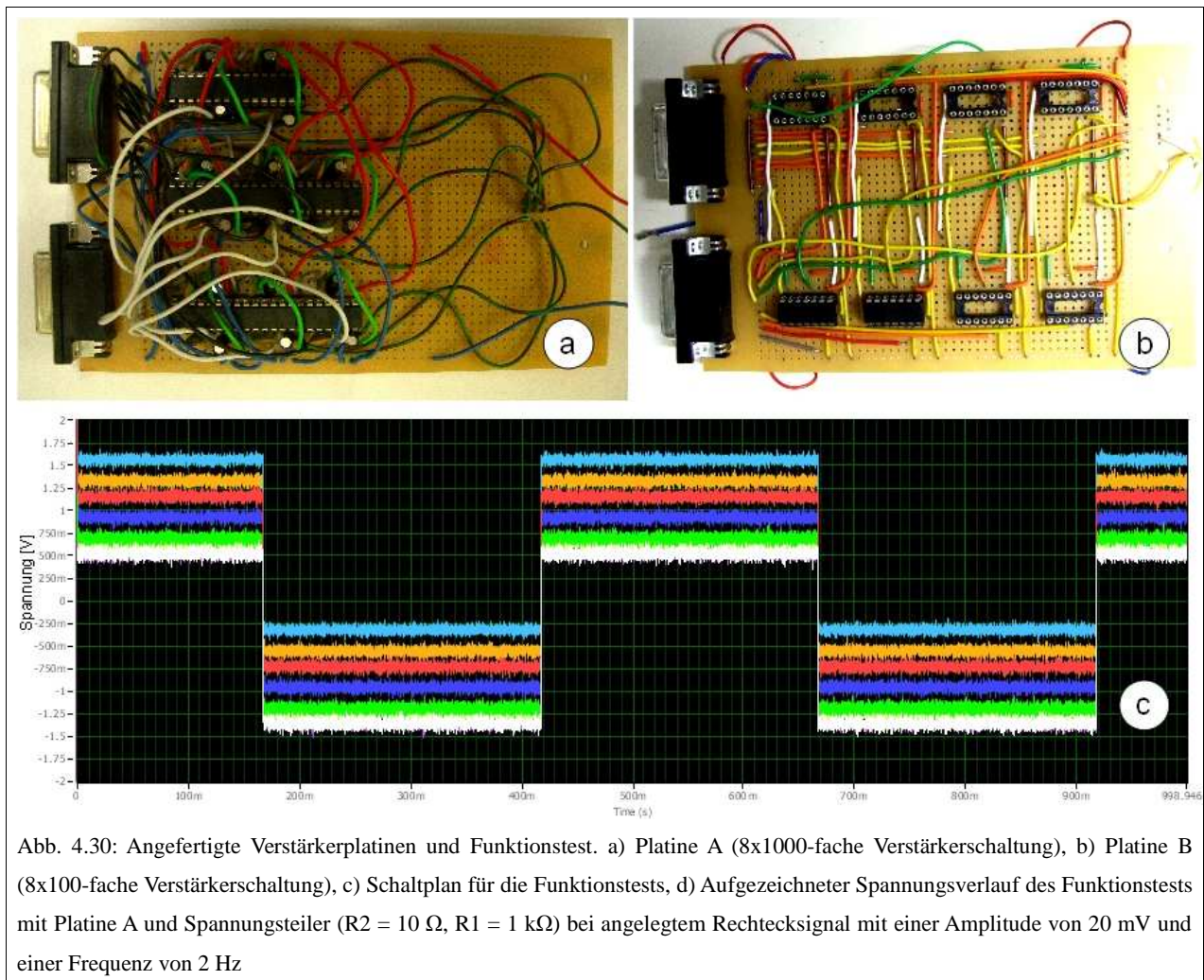


Abb. 4.29: Schematischer Schaltplan der Grundschaltung in mehreren Kanälen

Abb. 4.30.a und Abb. 4.30.b zeigen die getesteten Verstärkerplatten. Die Messergebnisse sind in Abb. 4.30.c zu sehen. Die einzelnen Kanäle werden darauf in verschiedenen Farben dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass der Offset der einzelnen Kanäle im Messaufbau begründet sein muss. Es zeigt sich, dass alle Kanäle unabhängig vom angelegten Signal gleich verstärken und das gleiche Rauschverhalten aufweisen. Da der Offset jedes Kanals individuell unterschiedlich ist, wurde angenommen, dass dieser individuelle Offset durch die verschiedenen Verstärker bedingt wird. Aufgrund des hohen Verstärkungsfaktors können nämlich schon minimale Unterschiede in den Widerständen im Innenaufbau des Verstärkers zu einem Offset dieses Ausmaßes führen (siehe Kap. 3.4.1).

Nun könnte es sein, dass es zwischen den Kanälen auf der Verstärkerplatte beispielsweise durch nebeneinander liegende ungeschirmte Signalleitungen zum elektrischen Übersprechen kommt. Außerdem wurde der elektrische Kontakt zum Biochip bisher nicht untersucht. Deswegen wurden in einem weiteren Test gemäß dem Schaltplan in Abb. 4.31 mit der angefertigten Kontakthalterung (siehe Abb. 3.32.a) Biochips kontaktiert (siehe Abb. 3.32.b) und die Kanäle nacheinander einzeln getestet, während die übrigen Kanäle offen blieben. In der experimentellen Umsetzung sieht das so aus, dass mit einem Kabel, an dem der Signalgenerator angeschlossen ist, nacheinander die Kontaktpads des Biochips abgetastet werden. Dabei war es unvermeidlich, dass zeitweise auch zwei Kontaktpads gleichzeitig kontaktiert wurden. Der Verstärkungsfaktor war wiederum für alle Kanäle auf einer Platine der selbe.



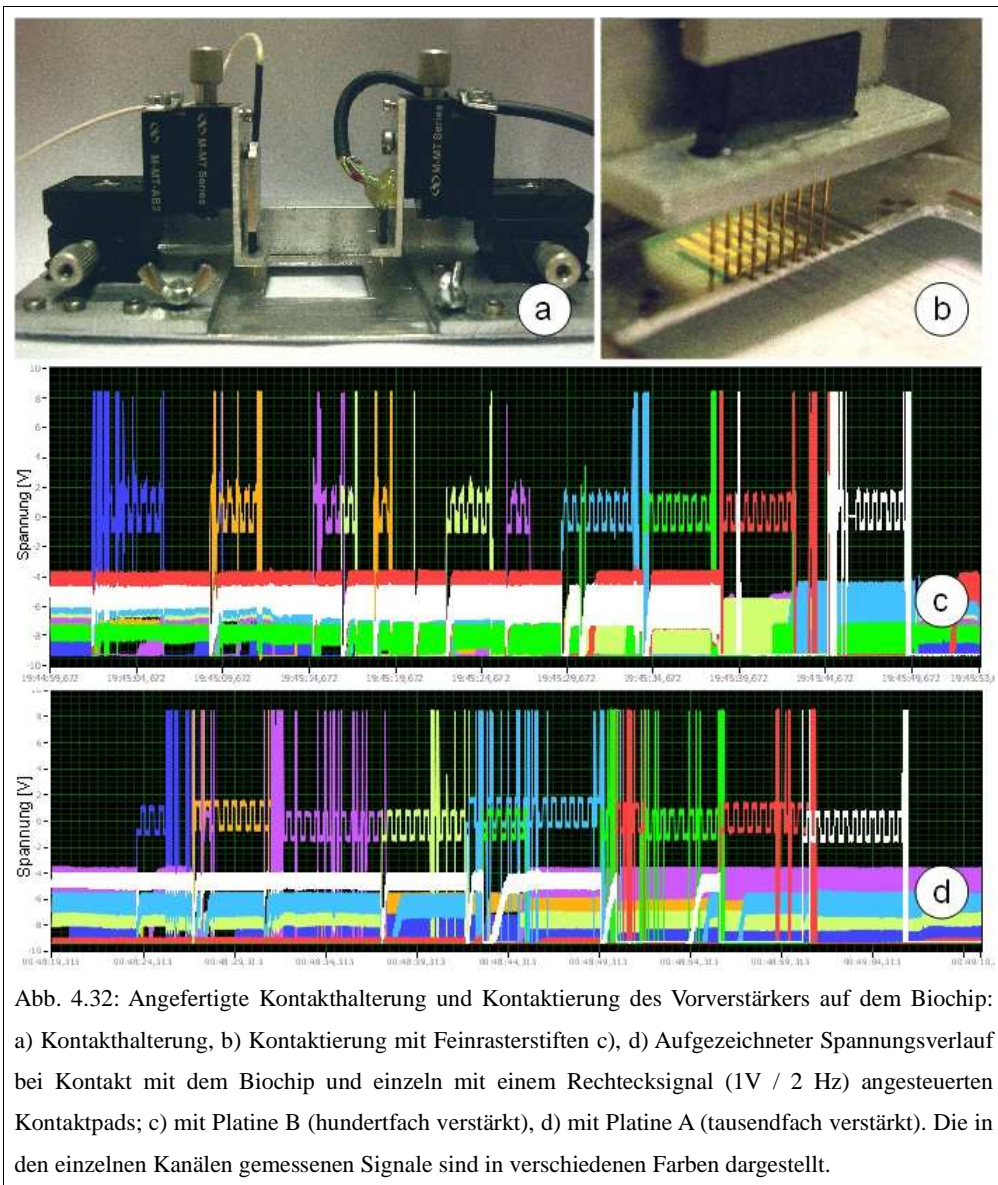


Abb. 4.32: Angefertigte Kontakthalterung und Kontaktierung des Vorverstärkers auf dem Biochip: a) Kontakthalterung, b) Kontaktierung mit Feinrasterstiften c), d) Aufgezeichneter Spannungsverlauf bei Kontakt mit dem Biochip und einzeln mit einem Rechtecksignal (1V / 2 Hz) angesteuerten Kontaktpads; c) mit Platine B (hundertfach verstärkt), d) mit Platine A (tausendfach verstärkt). Die in den einzelnen Kanälen gemessenen Signale sind in verschiedenen Farben dargestellt.

Die Messung an beiden Verstärkerplatinen (siehe Abb. 4.32.c, d) zeigt, dass die einzelnen Kanäle auch unabhängig voneinander funktionieren. In den signalfreien Kanälen konnten nur ein überhöhtes Rauschen, jedoch keine Spuren vom angelegten Rechtecksignal detektiert werden. Ein elektrisches Übersprechen konnte so ausgeschlossen werden. Außerdem beweisen die Signale, dass der Kontakt zum Biochip hergestellt ist.

Somit ist der Messaufbau gemäß der Zielsetzung der Ableitung neuronaler Signale komplett (siehe Abb. 4.33). Die Elektroden auf dem Biochip können auf der Halterung einzeln kontaktiert werden, und ihre so elektrisch abgeleiteten Signale auf der Platine verstärkt und von der Datenkarte erfasst werden. Dabei sind die Kanäle elektrisch voneinander isoliert.

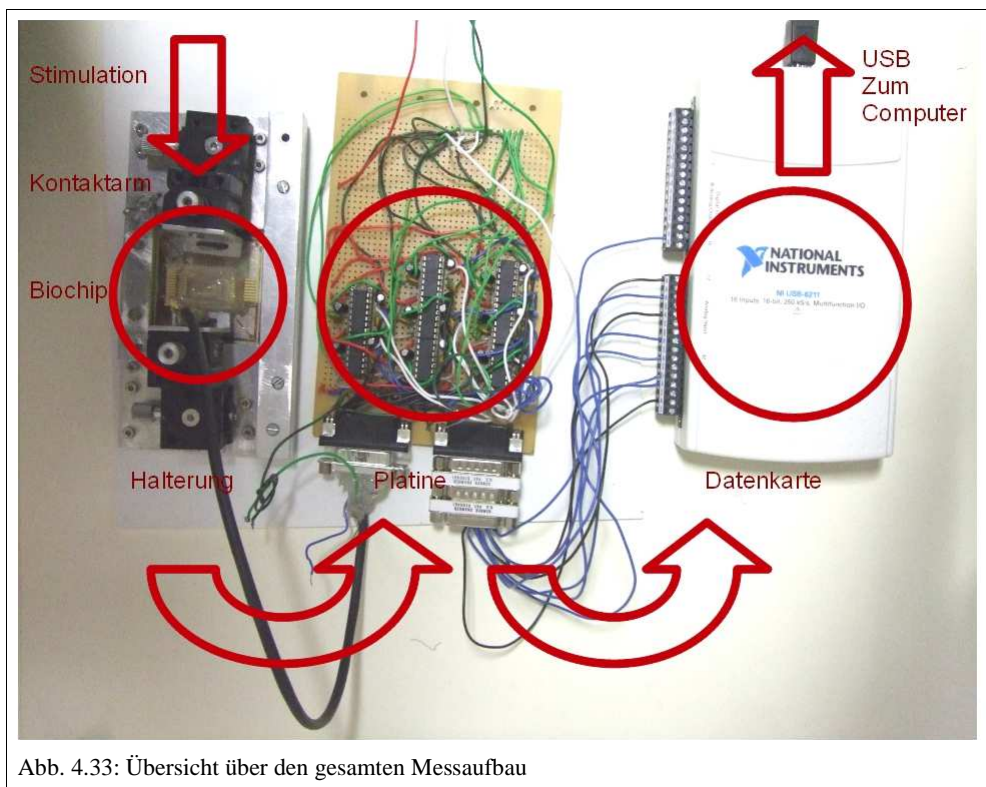


Abb. 4.33: Übersicht über den gesamten Messaufbau

4.3.5 SNR im Verstärkungsfaktorvergleich

Um den Einfluss des Verstärkungsfaktors auf das gemessene Signal-Rausch-Verhältnis (engl. Signal-noise-relation; **SNR**) zu bestimmen, wurden die beiden Verstärkerplatinen (x1000 und x100) miteinander verglichen. Als Signalquelle wurde in diesem Fall ein Biosignalsimulator von Multichannel Systems (siehe Kap. 3.5.3) eingesetzt. Dieser simuliert ein von einem MEA gemessenes neuronales Signal, was mit dem Signalgenerator selbst über aufwendigste Programmierung nur unter Einsatz eines Spannungsteilers möglich wäre, und störende Verzerrungen des Signals bewirken kann. Außerdem wird angenommen, dass der Signalgenerator geerdet ist, wodurch das Ergebnis zusätzlich verfälscht werden könnte (siehe Kap. 4.3.1).

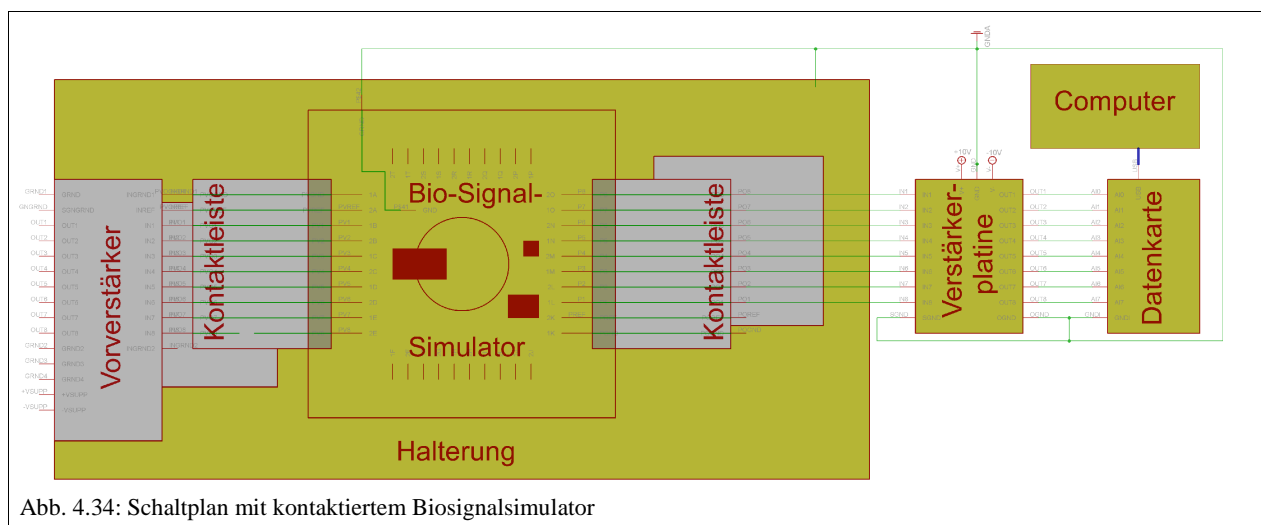


Abb. 4.34: Schaltplan mit kontaktiertem Biosignalsimulator

Ein schematischer Schaltplan des Messaufbaus ist in Abb. 4.34 dargestellt. Es wurden drei unterschiedliche Signalformen generiert (siehe Abb. 4.35.a – c). Diese simulieren von einem Biochip abgeleitete Exzitatorische Postsynaptische Potentialänderungen (EPSP, Abb. 4.35.a), Potentialverschiebungen im Elektrolyten aufgrund anhaltender Aktivität vieler beteiligter Neuronen (engl. Population spikes, Abb. 4.35.b), oder Aktionsimpulse (spikes, Abb. 4.35.c).

Die Messungen dieser simulierten Signale mit einem Verstärkungsfaktor von tausend (siehe Abb. 4.36.a, b, c) zeigen im Unterschied zu allen bisherigen Messungen, dass das Rauschen unter 50 mV lag. Das bedeutet, dass sich bei Messungen mit diesem Messaufbau Spannungsunterschiede von bis zu 100 μ V vom Rauschen unterscheiden lassen. Die Messungen mit einem Verstärkungsfaktor von hundert (siehe Abb. 4.36.d, e, f) zeigen ein gleich hohes Rauschen bei zehn mal kleinerer Signalamplitude. Die simulierten Aktionsimpulse gingen bei einem Verstärkungsfaktor von Hundert vollkommen im Rauschen unter (siehe Abb. 4.36.f).

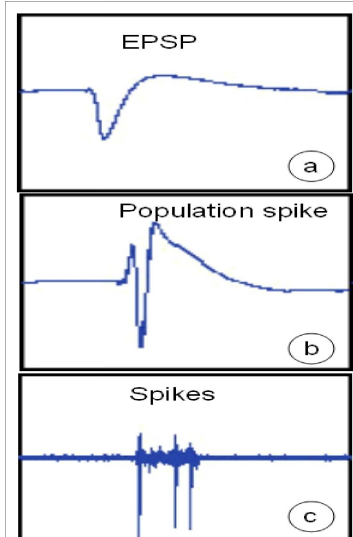


Abb. 4.35: Vom Biosignal-simulator erzeugte Signale:a) EPSP, b) Pop. Spikes, c) Spikes [33]

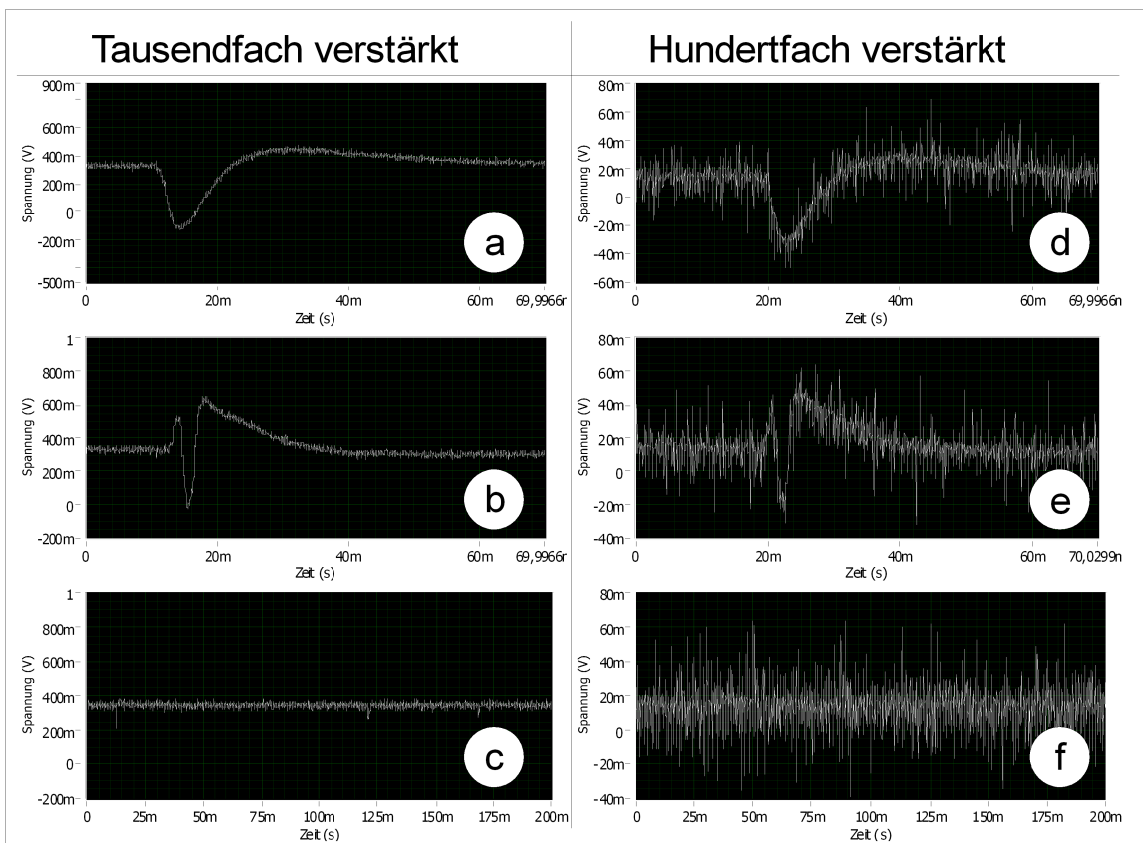


Abb. 4.36: Aufgezeichneter Spannungsverlauf simulierter Biosignale bei unterschiedlichen Verstärkungsfaktoren (a) – c) tausendfach d) – f) hundertfach). Die simulierten Biosignale waren: a), d) EPSP b), e) Population Spikes c), f) Axonale Signale (AIs).

Aus diesen Ergebnissen lassen sich zwei wesentliche Schlüsse ziehen. Erstens wurde deutlich, dass für die Messung von Aktionsimpulsen ein Verstärkungsfaktor von Tausend notwendig ist. Zweitens lassen sich mit dem Messaufbau Messgenauigkeiten von unter 100 μV erreichen. Da die einzige Änderung bei dieser Messung in Vergleich zu anderen Messungen mit schlechterem SNR in der Wahl der Signalquelle bestand, wurde angenommen, dass der Signalgenerator der Ursprung des zusätzlichen Rauschens war. Die Ergebnisse der Funktionstests der Grundsaltung (siehe Kap. 4.3.2) legen dabei den Schluss nahe, dass die Erdung des Signalgenerators damit zusammenhängt. Da sich die Amplitude des Rauschens nicht merklich mit dem Verstärkungsfaktor änderte, wurde weiter angenommen, dass der Großteil des gemessenen Rauschens nach der Verstärkerschaltung entsteht.

4.3.6 SNR bei stufenweiser Verstärkerschaltung

Eine zentrale Frage in dieser Arbeit ist, ob neuronale Signale direkt vorverstärkt werden müssen, um vom Hauptverstärker und der DAQ verarbeitet werden zu können. So wurde wiederum der Biosignalsimulator als Signalquelle beim Vergleich einer zweistufigen Verstärkerschaltung (1. Stufe: $\times 10$, 2. Stufe: $\times 100$) zu einer einstufigen Verstärkerschaltung (nur 2. Stufe: $\times 1000$) bei gleichem Gesamt- Verstärkungsfaktor eingesetzt. Für die zweistufige Verstärkerschaltung wurde als Vorverstärker der MPA8I von Microchannel Systems (siehe Kap. 3.3.1) verwendet. Die einstufige Verstärkerschaltung entspricht dabei dem in Abb. 4.34 gezeigten Schaltplan, die zweistufige Verstärkerschaltung dem in Abb. 4.37.

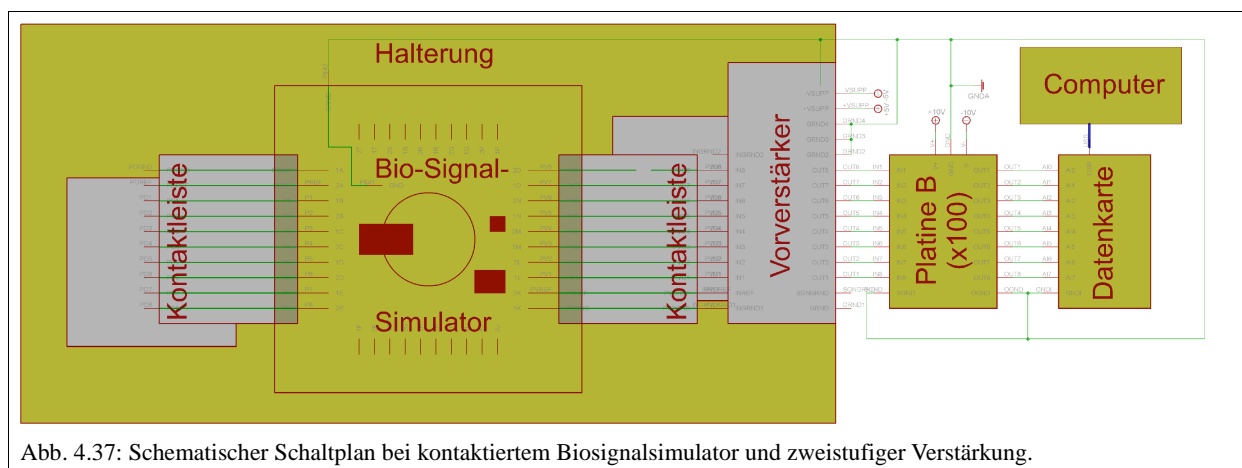
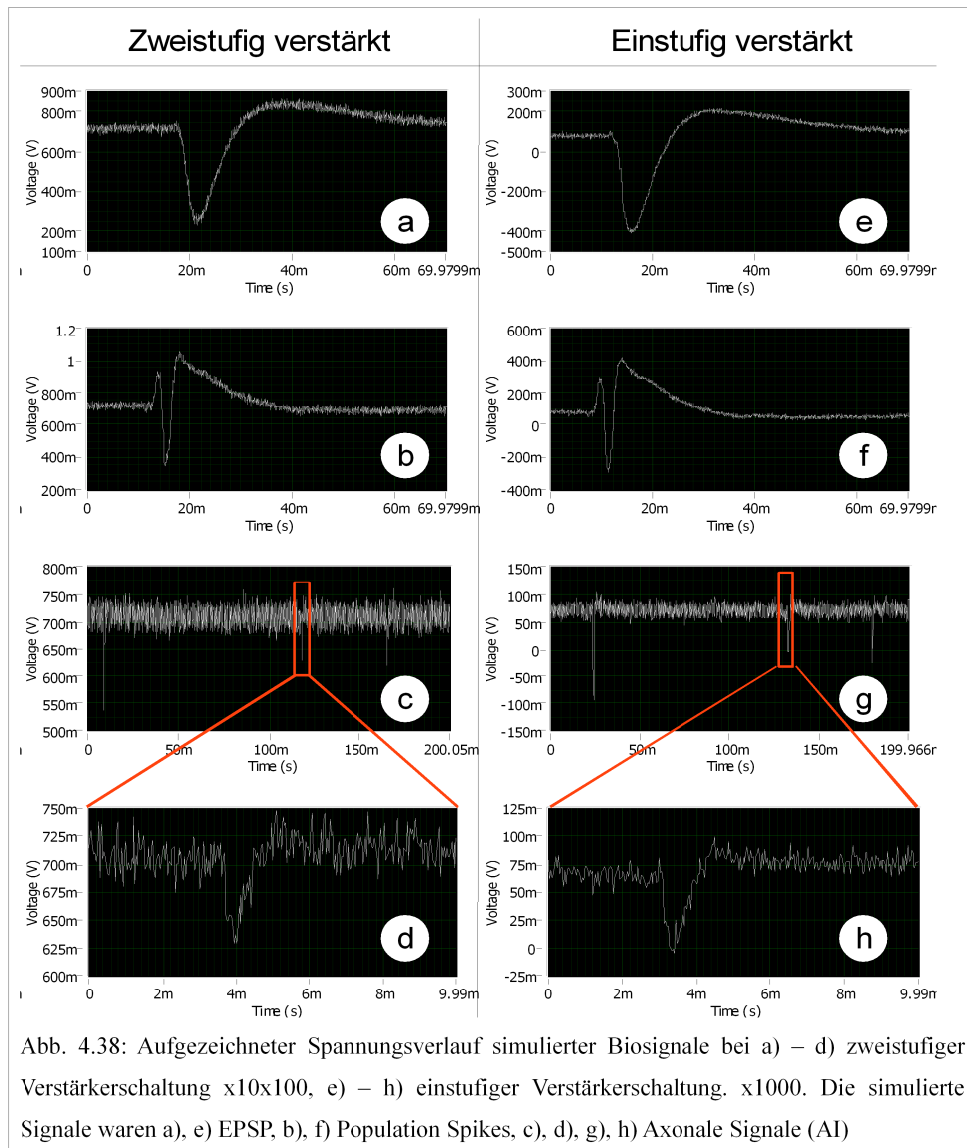


Abb. 4.37: Schematischer Schaltplan bei kontaktiertem Biosignalsimulator und zweistufiger Verstärkung.

Die experimentellen Daten (siehe Abb. 4.38) zeigen bei der zweistufigen Verstärkerschaltung (siehe Abb. 4.38.a – d) in dieser Konfiguration ein schlechteres SNR als bei der einstufigen Verstärkerschaltung (siehe Abb. 4.38.e – h). Zur Verdeutlichung wurde dazu jeweils der Verlauf eines aufgezeichneten simulierten Aktionsimpulses vergrößert dargestellt (siehe Abb. 4.38.d, h). Da das Signal in einer einstufigen Verstärkerschaltung über eine weitere Strecke unverstärkt geleitet wird, wäre in diesem Fall ein höheres Rauschen zu erwarten. Die Gründe für dieses etwas überraschende Ergebnis könnten mit einer fehlerhaften Wahl der Masseanschlüsse für den Vorverstärker zusammenhängen, was in Kap. 4.5.1 noch eingehender erläutert wird. Ein Vorverstärker ist jedenfalls nicht notwendig und wurde im Weiteren nicht eingesetzt.



4.4 Elektrodenbelegung

Wie in den vorigen Kapiteln dargelegt ist die Belegung der Masseanschlüsse von großer Bedeutung für die Rauschfreiheit eines Signals. Deshalb wurde ein Vergleich verschiedener Messweisen durchgeführt. Den unterschiedlichen Varianten des Masseanschlusses der Zellkulturkammer wurde dabei besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Im weiteren werden zunächst die Auswirkungen des Masseanschlusses der Zellkulturkammer ohne weitere elektrische Signale behandelt (siehe Kap. 4.4.1). Anschließend werden die Dreipunktmessung (siehe Kap. 4.4.2) und die Vierpunktmessung (siehe Kap. 4.4.3) qualitativ verglichen.

4.4.1 Auf Masse legen der Zellkulturkammer

Um den Einfluss des Masseanschlusses der Zellkulturkammer zu bestimmen, wurde zunächst ein Biochip mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt und gemäß dem in Abb. 4.39 dargestellten Schaltplan während der Messung massefrei („floatend“) kontaktiert. Dabei wurde kein Erregersignal generiert. Die aufgezeichneten Signale sind in Abb. 4.40 zu sehen. Es zeigt sich, dass die Kontaktierung zu einer Verschiebung des Offsets führt. Dies ist sehr wahrscheinlich ein Anzeichen für chemische Reaktionen an den Phasengrenzen (siehe Kap. 2.2.2). Die während des Kontaktvorgang auftretenden Spannungsspitzen könnten darauf hinweisen, dass während der Kontaktierung Ladungsverschiebungen an den Elektrodenoberflächen auftreten.

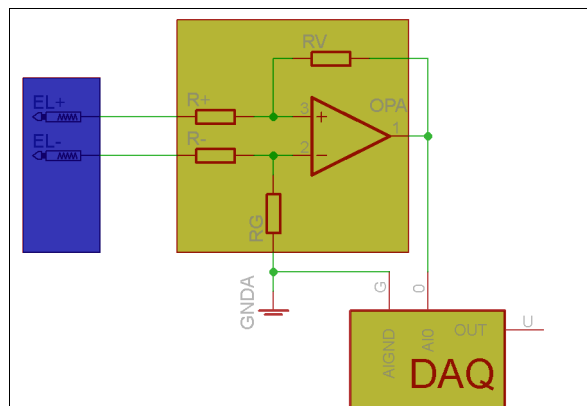


Abb. 4.39: Schematischer Schaltplan bei floatendem Kontakt mit den Messelektroden in Flüssigkeit

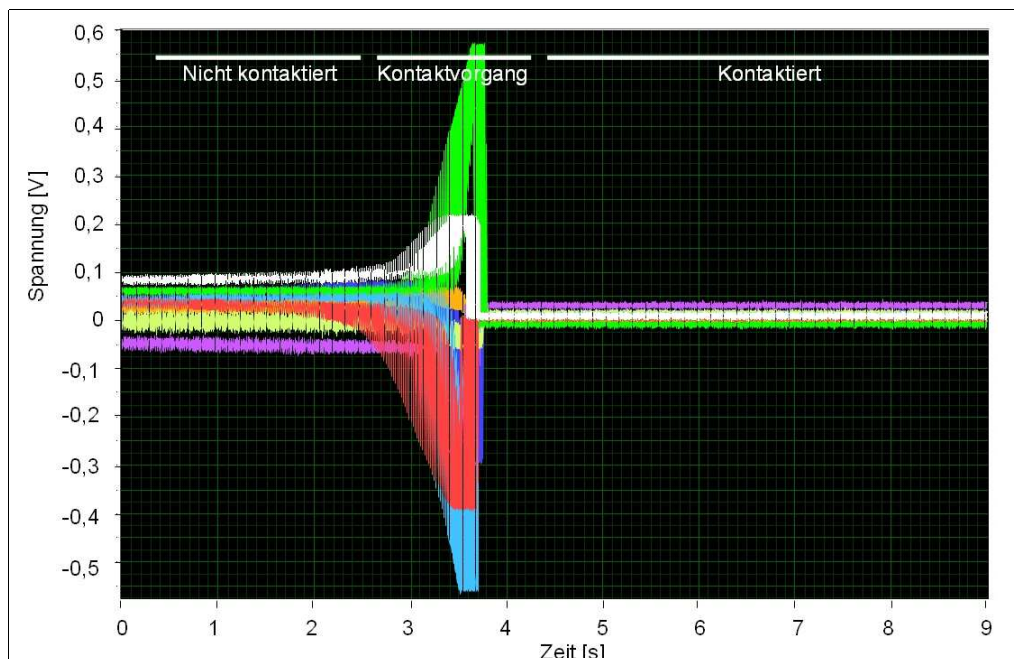


Abb. 4.40: Aufgezeichnete Spannungsverläufe bei der massefreien Kontaktierung des mit physiologischer Kochsalzlösung befüllten Biochips, tausendfach verstärkt. Die Signale der unterschiedlichen Elektroden sind in verschiedenen Farben dargestellt.

In einem anschließenden Versuch wurde die Zellkulturkammer gemäß dem in Abb. 4.41 dargestellten Schaltplan während der Messung mit Hilfe der Referenzelektrode (Ag/AgCl) auf ein konstantes Massepotential gelegt.

Die Ergebnisse der sind in Abb. 4.42 zu sehen. Es zeigt sich, dass die Offsetspannung schon so hoch ist, dass alle Kanäle zu beiden Seiten aus dem Auflösungsbereich verschwinden. Dies ist auf eine ungleichmäßige Potentialverteilung an den Elektroden zurückzuführen. Dabei sind auch die Phasengrenzeneffekte an den Elektrodenoberflächen zu berücksichtigen. Da die Kanäle zu beiden Seiten aus dem Auflösungsbereich verschwinden, reicht es nicht aus, die Offsetspannung am Signalgenerator anzupassen, um alle Kanäle in den Auflösungsbereich zu bekommen. Diese Schwierigkeit bei der Messung wird im Weiteren noch behandelt.

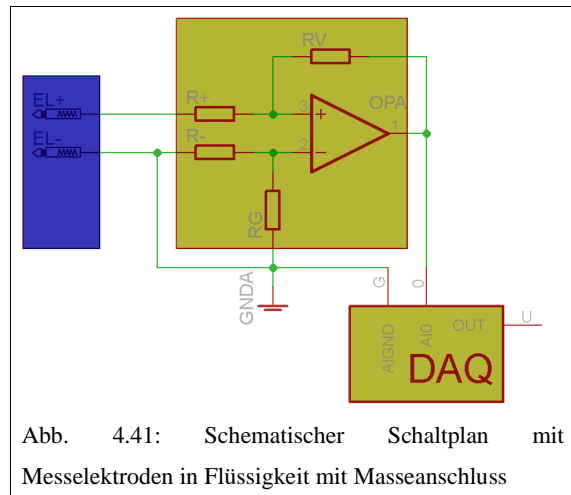


Abb. 4.41: Schematischer Schaltplan mit Messelektroden in Flüssigkeit mit Masseanschluss

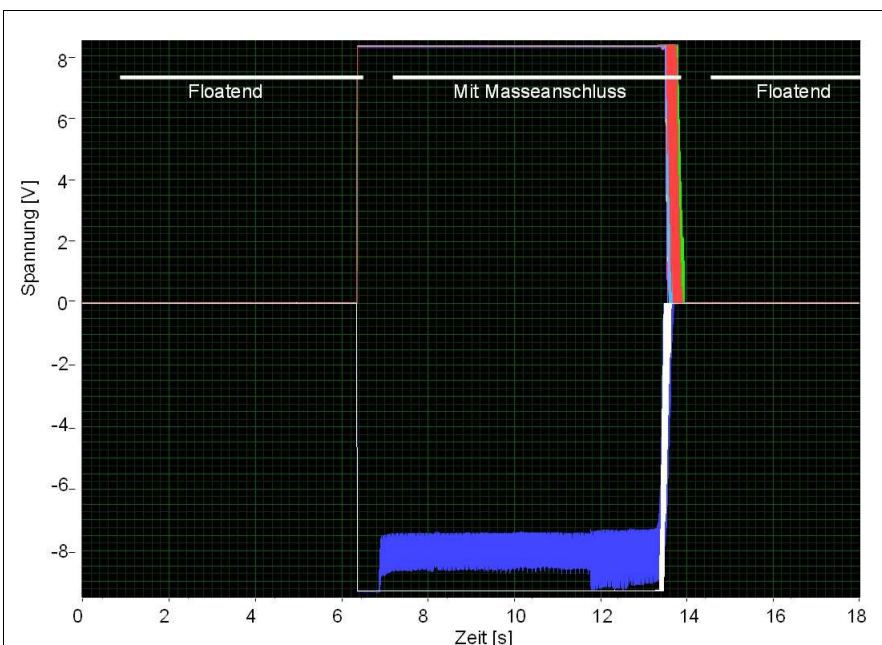


Abb. 4.42: Zeitlicher Spannungsverlauf an den Elektroden während der Kontaktierung des Masseanschlusses mit der Referenzelektrode in der Zellkulturkammer.

4.4.2 Dreipunktmessung

Bei der Dreipunktmessung sind die Masse des generierten Signals (SG-) wie auch die Masse der Verstärkerplatine (SGN GND) über die gleiche Bezugselektrode (Ag/AgCl), mit der Zellkulturkammer verbunden. Ein schematischer Schaltplan ist in Abb. 4.43 dargestellt. Über die Stimulationselektrode wurde pro Sekunde ein 500µs andauernder Spannungspuls mit einer Amplitude von 100 mV in die Zellkulturkammer geleitet. Damit die Signalantworten aufgezeichnet werden können, wurde zusätzlich eine geringe Offsetspannung angelegt (siehe Kap. 4.4.1).

Bei einer Wiederholfrequenz von 1 Hz wurden die dargestellten Signalkurven mit tausendfach verstärkten Pulsamplituden von 23 V erfasst (siehe Abb. 4.44). Die Messung zeigt, dass der generierte Spannungspuls mit einer Amplitude von 100 mV an den Messelektroden einen Spannungsunterschied von rund 23 mV bewirkte. Das abgenommene Spannungssignal unterlag dabei einem Drift von 500 $\mu\text{V/s}$. Damit die Signale nicht aus dem Auflösungsbereich rutschen, müsste deswegen bei dieser Messschaltung die Offsetspannung ständig nachjustiert werden. Dies gestaltet sich aufgrund des starken Drifts und der verzögerten Reaktion der Elektroden schwierig. Aus diesem Grund wurde ein Nachregeln der Offsetspannung, ob nun am Signalgenerator und somit für alle Kanäle oder an jedem Kanal extra an der dafür vorgesehenen Offsetsteuerung auf dem Verstärker, als nicht zielführend eingestuft.

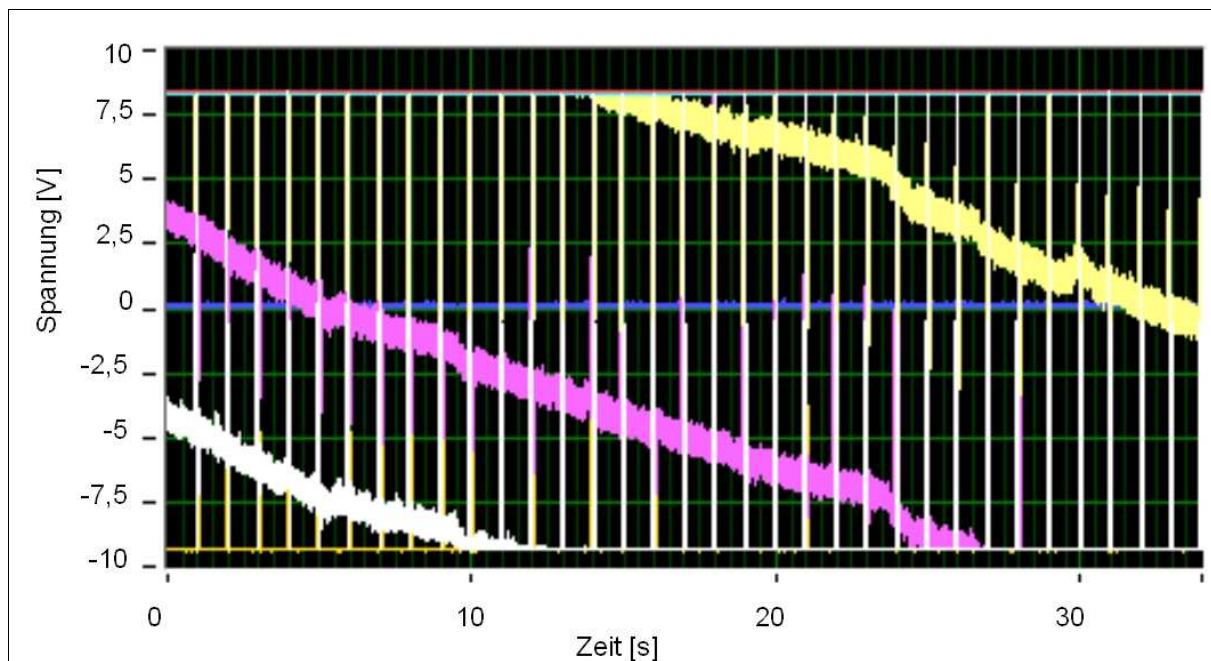
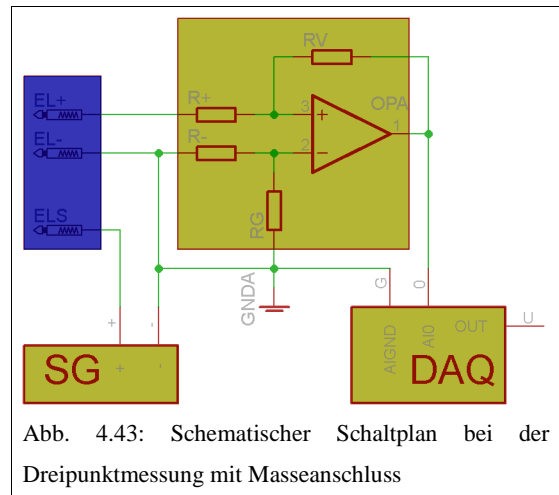
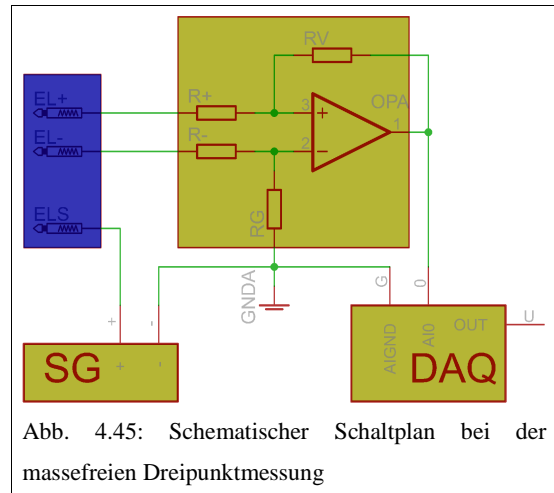
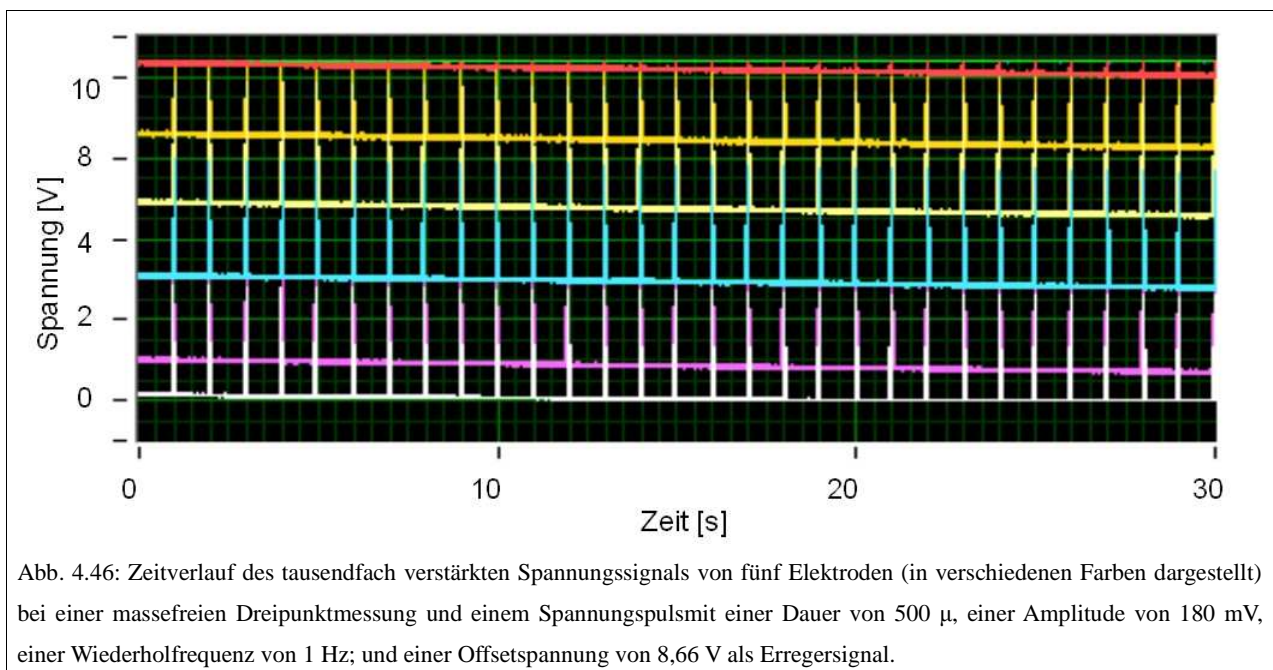


Abb. 4.44: Zeitverlauf des tausendfach verstärkten Spannungssignals von drei Elektroden (in verschiedenen Farben dargestellt) bei einer Dreipunktmessung mit einer Referenzelektrode (Ag/AgCl) als Massepotential und einem Spannungspuls mit einer Dauer von 500 μs , einer Amplitude von 100 mV, einer Wiederholfrequenz von 1 Hz; und einer Offsetspannung von 1,9 V als Erregersignal.

Eine im Lauf der Arbeit entwickelte Alternative, um dieses Problem zu umgehen, sieht eine Signalgenerierung/Stimulation ohne Masseanschluss des Elektrolyts vor. Ein schematischer Schaltplan ist in Abb. 4.45 dargestellt. Dazu wird der Verstärker in den negativen Bereich übersteuert (Offsetspannung = 9 V), das heißt das Potential des Elektrolyts in der Zellkulturkammer wird sich diesen 9 V Offsetspannung entsprechend einstellen. Somit werden zwar nur noch positive Unterschiede der Elektrodenpotentiale gemessen (was um AIs zu detektieren ausreichen könnte), andererseits könnten aufgrund des inneren Aufbaus des Instrumentenverstärkers die Potentialunterschiede somit zwar gedämpft, jedoch schärfer gemessen werden, der Verstärker stellt hierbei eine Art Hochpassfilter dar.



Aufgrund der massefreien Zellkulturkammer ist diese Methode nicht empfehlenswert, obwohl entsprechende Messschaltungen sinnvoll erscheinende Ergebnisse zeigen (siehe Abb. 4.46). So sind die Spannungen an allen Elektroden in etwa gleich hoch, und es wird eine Auflösung beinahe aller Eingänge in einer Messung erreicht. Durch den Offset geht jedoch die Hälfte des Auflösungsbereichs verloren. Festgehalten werden sollte noch, dass der an der generierte Spannungsimpuls mit einer Amplitude von 180 mV an den Messelektroden einen Spannungsunterschied von 2 mV bewirkte. Bei einem Verstärkungsfaktor von Tausend und einer Wiederholfrequenz von 1 Hz ergaben sich damit die dargestellten erfassten Signalkurven mit Pulsamplituden von 2 V. Die Amplitude beträgt damit rund zwanzig mal weniger als gemäß vorigen Versuch zu erwarten wäre, wenn das Potential der Zellkulturkammer auf Masse gelegen wäre. Da die Dreipunktmessung aufgrund der beschriebenen Probleme wenig geeignet ist, wurden weitere Messmethoden untersucht.



4.4.3 Vierpunktmessung

Bei der Vierpunktmessung wird die Bezugsmasse des Signalgenerators von den Verstärkereingängen getrennt. Der Masseanschluss des Signalgenerators wurde mit der Referenzelektrode (AG/AgCl) verbunden. Die invertierenden Verstärkereingänge wurden mit der metallischen Referenzelektrode auf dem MEA verbunden. Ein schematischer Schaltplan ist in Abb. 4.47 dargestellt. Mit Hilfe des Signalgenerators wurde über die Stimulationselektrode ein Rechtecksignal mit einer Amplitude von 20 mV und einer Frequenz von 1 Hz in die Zellkulturkammer geleitet. Auch hierbei musste eine Offsetspannung (1,8 V) eingestellt werden, um die Signale in den Auflösungsbereich des Verstärkers zu verschieben.

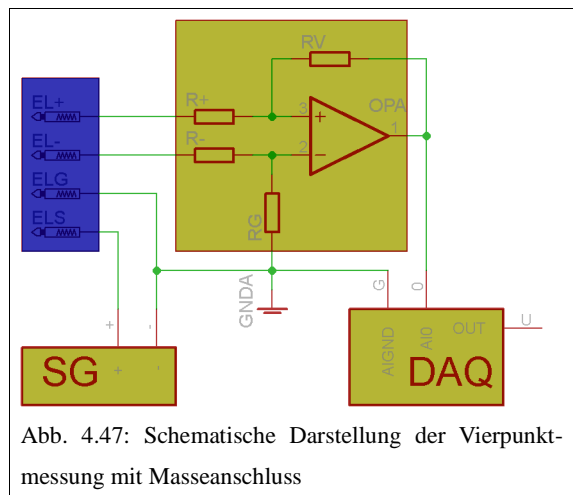


Abb. 4.47: Schematische Darstellung der Vierpunktmessung mit Masseanschluss

Abb. 4.48 zeigt den an zwei Elektroden gemessenen Spannungsverlauf tausendfach verstärkt. Die Krümmung der Kurve im Vergleich zum rechteckigen Erregersignal verdeutlicht die kapazitiven Effekte zwischen den Elektroden. Zum Vergleich mit der in Kap. 4.4.2 beschriebenen Dreipunktmessung mit einem generierten Spannungsimpuls von 500 μ s Dauer wurde der Spannungsabfall von 8 V an der scharfen Kante des gemessenen Signals herangezogen. Das Ergebnis zeigt, dass die Signalübertragung durch die Vierpunktmessung signifikant verbessert wurde. So konnte im Vergleich zur Dreipunktmessung das Rauschen auf weniger als zwei drittel reduziert werden, während sich die Signalamplitude vergleichsweise fast verdoppelt. Für weitere Messungen wurden deswegen die Anschlüsse gemäß der Vierpunktmessung gewählt.

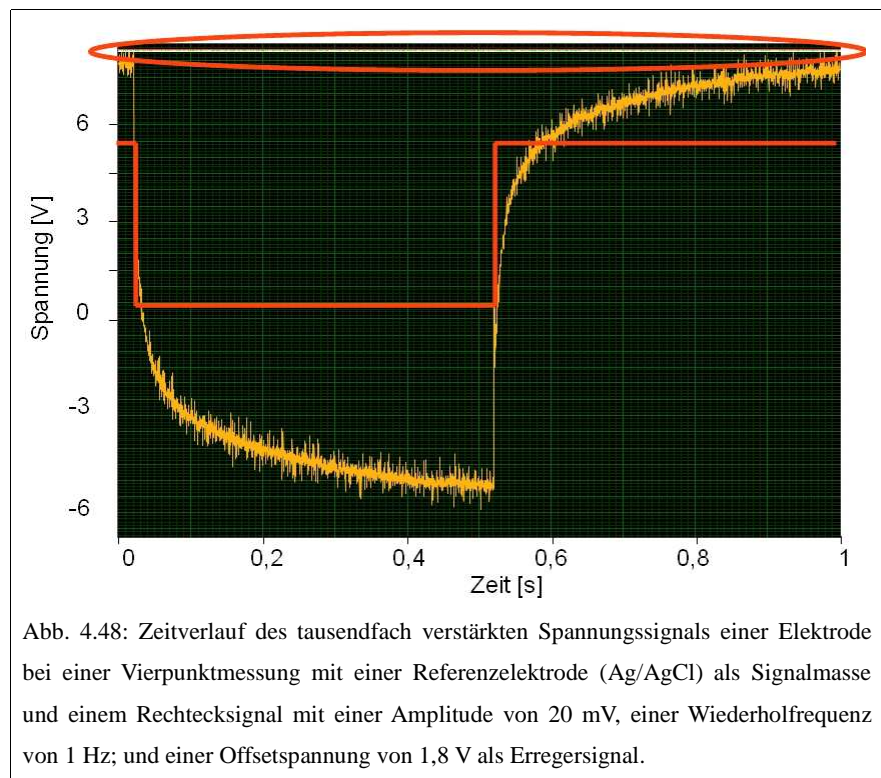


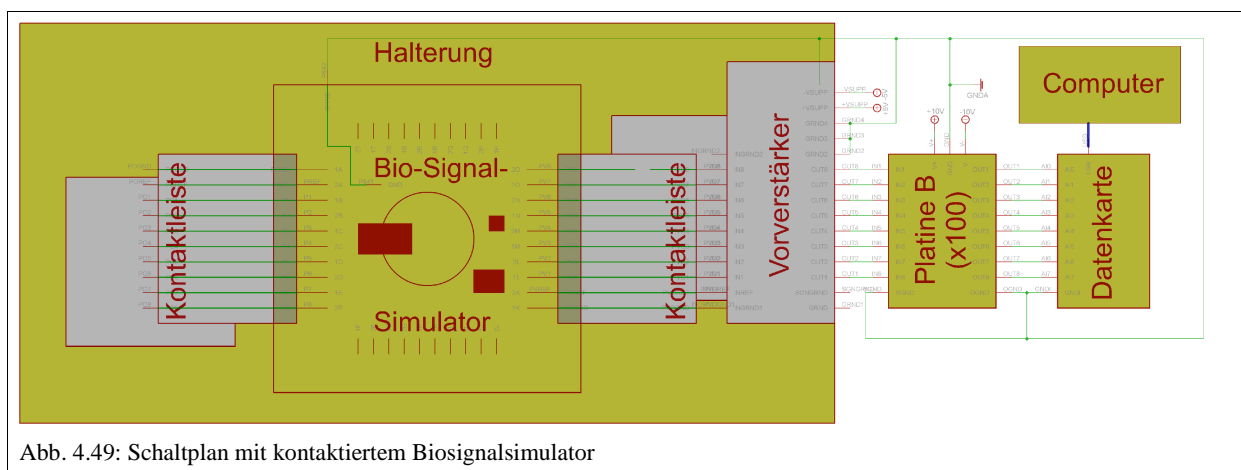
Abb. 4.48: Zeitverlauf des tausendfach verstärkten Spannungssignals einer Elektrode bei einer Vierpunktmessung mit einer Referenzelektrode (Ag/AgCl) als Signalmasse und einem Rechtecksignal mit einer Amplitude von 20 mV, einer Wiederholfrequenz von 1 Hz; und einer Offsetspannung von 1,8 V als Erregersignal.

4.5 Rauschreduktion

Bei den vom Verstärker aufgezeichneten Signalen wurde das Rauschen als wesentlicher Störfaktor identifiziert. Deswegen wurden Rauschursachen und mögliche Filterschaltungen untersucht. Im speziellen wurde der Einfluss des Masseanschlusses (siehe Kap. 4.5.1) und der Schirmung (siehe Kap. 4.5.2), die Rauschreduktion mit Tiefpassfiltern (siehe Kap. 4.5.3) und Hochpassfiltern (siehe Kap. 4.5.4) sowie eine softwarebasierte Signalkonditionierung (siehe Kap. 4.5.5) analysiert.

4.5.1 Stromquellenvergleich

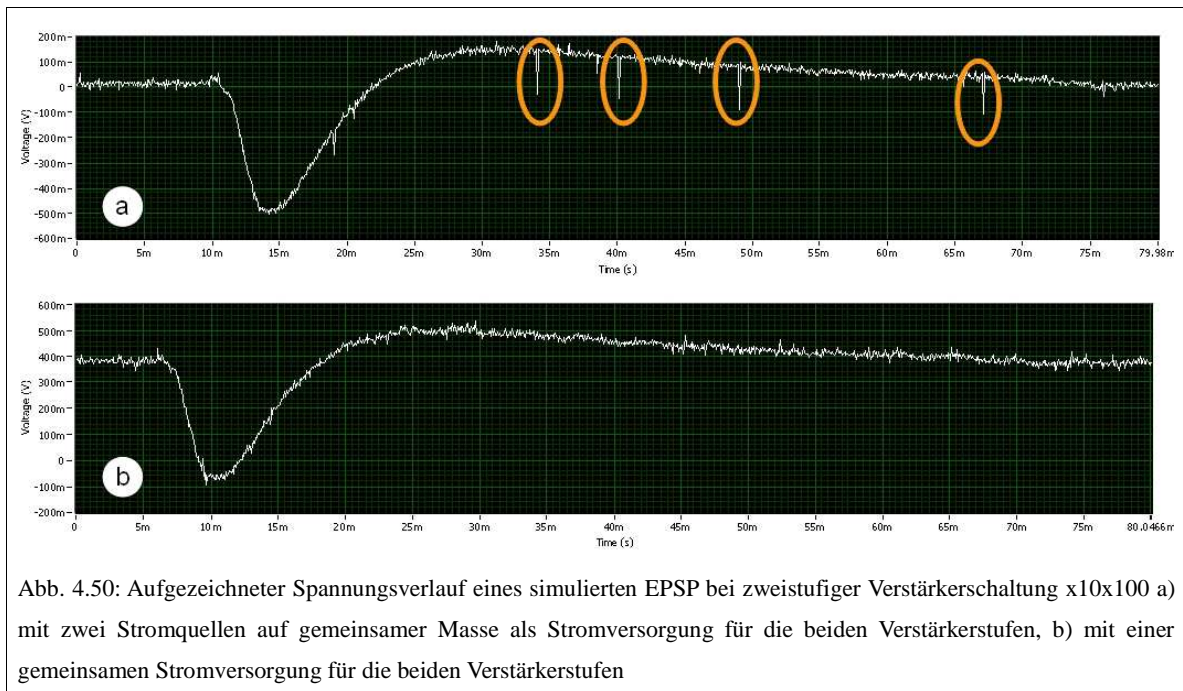
Als eine mögliche Ursache des Rauschens wurden die Stromquellen untersucht. Da bei der Messung mit Vorverstärker zwei Stromquellen eingesetzt wurden, bot sich bei diesen Messungen ein zusätzlicher Stromquellenvergleich an. Dazu wurde wie in Kapitel 4.3.6 gemäß dem Schaltplan in Abb. 4.49 eine zweistufige Verstärkerschaltung eingesetzt, wobei die beiden Verstärker entweder mit einer gemeinsamen Stromversorgung oder mit jeweils anderen Stromquellen betrieben wurden. Um zwei unterschiedliche Versorgungsspannungen zu erzeugen, wurden zwei Serienschaltungen aus jeweils gleichartigen Stromquellen auf eine gemeinsame Masse gelegt. Der Massepunkt war dabei in beiden Serienschaltungen der Verbindungspunkt der beiden Stromquellen. Als Signalquelle wurde wiederum der Biosimulationschip verwendet.



Die bei einem simulierten EPSP aufgezeichneten Signalantworten sind in Abb. 4.50 dargestellt. Abb. 4.50.a zeigt den gemessenen Spannungsverlauf unter Verwendung zweier getrennter Versorgungsspannungen, Abb. 4.50.b zeigt den aufgezeichneten Spannungsverlauf unter Verwendung einer gemeinsamen Versorgungsspannung.

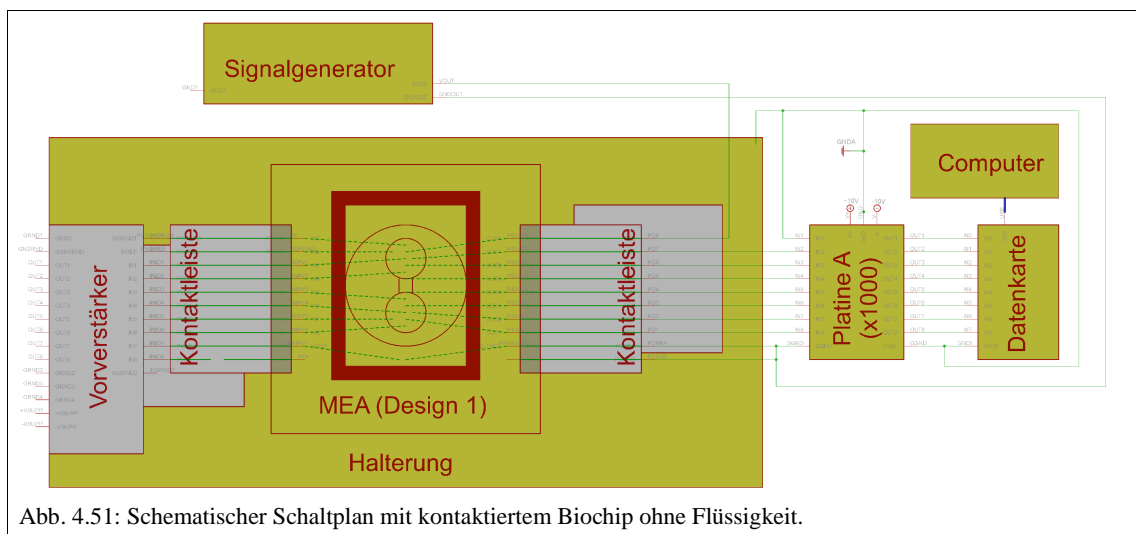
Beim Einsatz zweier getrennter Stromquellen mit gemeinsamer Masse kam es zu sprunghaften Störsignalen. Diese Störsignale traten im Versuch mit einer gemeinsamen Stromquelle nicht auf. Dabei wurden keine wesentlichen Unterschiede festgestellt, wenn als Stromquellen anstatt der Netzgeräte Batterien eingesetzt wurden.

Der Ursprung der Störsignale konnte nicht genauer geklärt werden, jedoch liegt der Schluss nahe, dass das Zusammenlegen der beiden Massepunkte der Stromversorgung zu diesen Effekten führt. Für weitere Versuche mit einer zweistufigen Verstärkerschaltung (siehe Kap. 4.3.6 und Kap. 4.5.3) wurde deshalb auf eine gemeinsame Stromversorgung zurückgegriffen. Die Versorgungsspannung wurde hierzu mit $\pm 5\text{ V}$ gewählt, um beide Verstärker versorgen zu können.



4.5.2 Funkübertragung und Schirmung

Auch von außen eintreffende Störsignale (z.B. Funksignale) kommen als Rauschquellen in Betracht. Da darauf verzichtet wurde, den Verstärker und die Signalkabel zu schirmen, der Stimulus aber im gleichen Kabel wie die Eingänge des Verstärkers geführt wird, erschien es sinnvoll, den Einfluss der Funkübertragung zu messen. Dazu wurde die Kontakthalterung zwar angeschlossen und mit dem Biochip kontaktiert, aber die Zellkulturkammer nicht mit Flüssigkeit gefüllt, sodass das gemessene Grundsignal dem **Netzbrumm** (bei 50 Hz in Mitteleuropa) entspricht. Mit Hilfe des Signalgenerators wurden anschließend im Intervall von 100 ms Pulse mit einer Dauer von 1 ms und variierter Amplitude (100 mV – 2 V) erzeugt. Abb. 4.51 zeigt einen dem Messaufbau entsprechenden schematischen Schaltplan.



Die Messergebnisse mit variiert Signalamplitude sind in Abb. 4.52.a – f zu sehen. In allen Abbildungen sind zwei Formen von Störsignalen zu erkennen. Zum einen der 50 Hz Netzbrumm mit einer bei sich ändernden Signalamplitude gleich bleibenden Amplitude von 1 – 2 V je nach Kanal, zum anderen ein sich zeitlich wiederholendes sprunghaftes Störsignal, dessen Amplitude mit der generierten Pulsamplitude steigt. Dabei ist zu beachten, dass die eingefangenen Störsignale nur aufgrund der offenen Eingänge solche Ausmaße erreichen. Es zeigt sich, dass die Auswirkungen der Funkübertragung bei der relevanten Amplitude des Stimulus ($< 1\text{ V}$) im Vergleich zum Netzbrumm vernachlässigbar ist ($< 50\%$).

Da in den bisher aufgezeichneten Signalen bei beschalteten Eingängen der Netzbrumm mit 50 Hz nicht identifiziert werden konnte, wurde angenommen, dass sich eine Schirmung der Leitungen nur unwesentlich auf das Rauschverhalten auswirkt. Jedenfalls müssen noch zusätzliche Rauschquellen vorliegen, deren Störsignale sich auf die Messung stärker auswirken als die durch Funkübertragung eingefangenen Störsignale. Es liegt zwar auf der Hand, dass insbesondere ein Rauschen von 50 Hz mittels Schirmung reduziert werden kann, jedoch sollten zunächst andere Methoden der Rauschreduktion untersucht werden, da durch die Schirmung allein keine merkliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses zu erwarten ist.

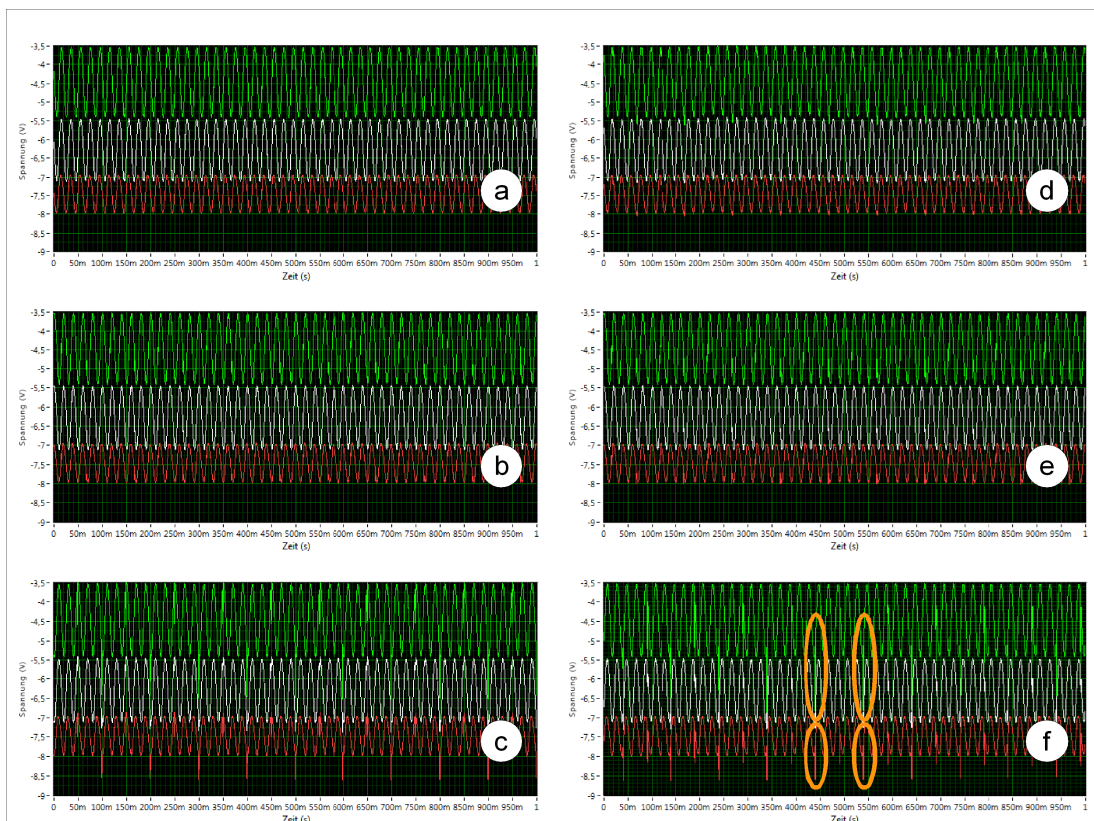
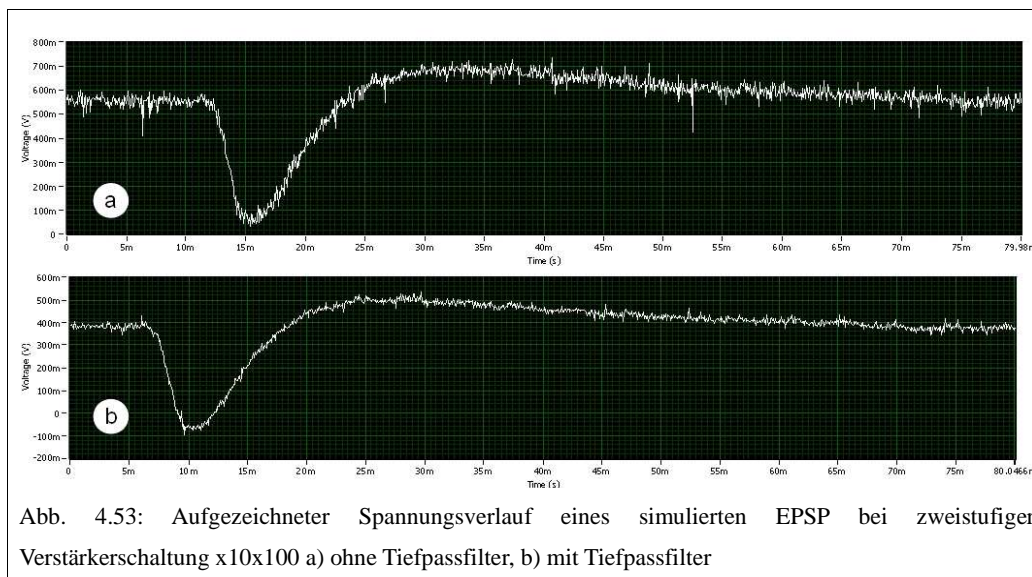


Abb. 4.52: Aufgezeichneter Spannungsverlauf an drei Eingängen (weiß: AIN3, rot: AIN4, grün: AIN5) bei der tausendfach verstärkten Funkübertragung eines generierten Spannungspulses mit einer Dauer von 1 ms, einer Wiederholfrequenz von 10 Hz und unterschiedlicher Signalamplitude: a) 100 mV, b) 200 mV, c) 300 mV, d) 500 mV, e) 1 V, f) 2 V

4.5.3 Tiefpassfiltervergleich

Zur Entfernung von hochfrequenten Störsignalen wurden Tiefpassfilter untersucht. Da auf der 100x-Verstärkerplatine vier Verstärker ohne Filterkondensatoren verlötet wurden, war es möglich, beim Vorverstärkervergleich ebenfalls den Einfluss des Tiefpassfilters (mit einer Grenzfrequenz von 100kHz) auf das Rauschverhalten zu messen. Der Messaufbau entsprach dabei in Analogie zu Kap. 4.3.6 und Kap. 4.5.1 dem in Abb. 4.49 dargestellten Schaltplan. Als Signal wurde wiederum ein EPSP simuliert.

In Abb. 4.53.a wird der Spannungsverlauf eines ungefiltert verstärkten, simulierten Biosignalssignals gezeigt, in Abb. 4.53.b der Spannungsverlauf eines gefilterten Signals. Das Rauschen von 100 mV im ungefilterten Fall konnte durch den Tiefpassfilter auf ein Viertel (25 mV) reduziert werden. Obgleich der Tiefpassfilter die Ausgangsspannung des Verstärkers filtert, kann er also merklich zur Rauschreduktion beitragen. Deswegen sollten in weiteren Experimenten Tiefpassfilter eingesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden wie in Kap.3.4.3 beschrieben in allen Kanälen auf den Verstärkerplatten Filterkondensatoren verlötet.



4.5.4 Hochpassfiltervergleich

Zur Entfernung niederfrequenter Störsignale wurden Hochpassfilter eingesetzt. Damit die Phasengrenzeneffekte die Elektrodenpotentiale nicht in den Aussteuerbereich (alle Spannungen über 10 V; bei einem Verstärkungsfaktor von 1000 alle Eingangsspannungen größer als 10 mV) der Eingänge des Verstärkers drängen, sollte ein Hochpassfilter zwischen der Kontakthalterung und der Verstärkerschaltung eingesetzt werden. Um diesen zu dimensionieren, wurde ein 8-Kanal-Hochpassfilter aus verschiedenen Widerständen und Kondensatoren aufgebaut und die Grenzfrequenzen berechnet (siehe Kap. 3.5.4). Dieser Hochpassfilter wurde gemäß dem in Abb. 4.54 dargestellten Schaltplan in den Messaufbau integriert. Dazu wurde ein nach Design 2 hergestellter Biochip mit physiologischer Kochsalzlösung befüllt und mit dem Messaufbau kontaktiert. Anschließend wurde über die Stimulationselektrode ein Rechtecksignal mit einer Amplitude von 20 mV und einer Frequenz von 1 Hz in die Zellkulturkammer geleitet.

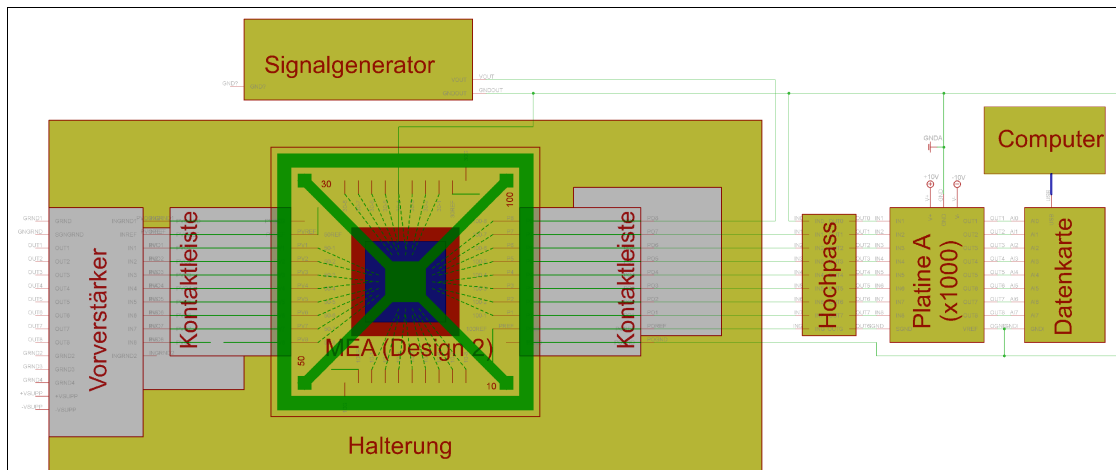


Abb. 4.54: Schematischer Schaltplan für den Vergleich des Hochpassfilters

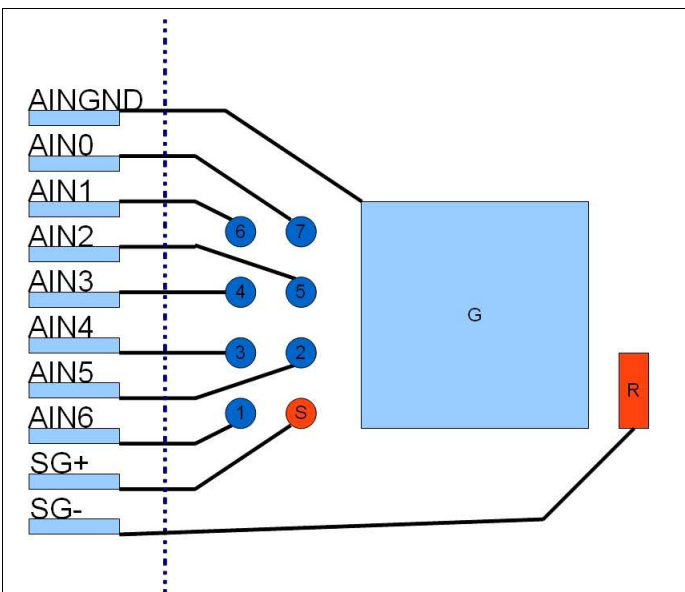


Abb. 4.55: Schematische Darstellung der Elektrodenbelegung auf dem MEA (nach Design 2) und der Referenzelektrode R nach der Vierpunktmessung

Die Spannungen an den Elektroden wurden gemäß der in Abb. 4.55 dargestellten Elektrodenbelegung nach der Vierpunktmessung (siehe Kap. 4.4.3) abgeleitet. Die abgeleiteten Signale wurden anschließend einzeln mit Hochpassfiltern unterschiedlicher Dimensionierung gefiltert, bevor sie tausendfach verstärkt mit der Datenkarte erfasst wurden. Die Filterdimensionierungen sind Tab. 4.4 zu entnehmen.

Bauteile für den Hochpassfilter			
Kanal	Widerstand	Kapazität	Grenzfrequenz
AIN0	R1 = 47 kΩ	C1 = 33 nF	F1 = 113 Hz
AIN1	R2 = 100 kΩ	C2 = 33 nF	F2 = 48 Hz
AIN2	R3 = 1 MΩ	C3 = 33 nF	F3 = 4,8 Hz
AIN3	R4 = 10 MΩ	C4 = 33 nF	F4 = 0,5 Hz
AIN4	R5 = 47 kΩ	C5 = 1 μF	F5 = 3,3 Hz
AIN5	R6 = 10 MΩ	C6 = 100 pF	F6 = 159 Hz
AIN6	R7 = 1 MΩ	C7 = 100 pF	F7 = 1590 Hz

Tab. 4.4: Wahl der Widerstände und Kondensatoren für den Hochpassfilter sowie resultierende Grenzfrequenz für 7 Kanäle

Abb. 4.56 zeigt die dabei mit der Datenkarte aufgezeichneten Signale. Die Abb. 4.56.a – f zeigen komplett verschiedene Spannungsverläufe an den jeweiligen Eingängen (AIN0 – AIN5). Dabei treten die Signalantworten auf das Erregersignal als Peaks auf, welche den Kanten des Rechtecksignals entsprechen. Um die Eignung der unterschiedlichen Hochpassfilterschaltungen zu vergleichen, müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Einerseits zeigen AIN0 (siehe Abb. 4.56.a) und AIN1 (siehe Abb. 4.56.b) wesentlich höhere Signalantworten als die übrigen Kanäle, andererseits werden die Signale auch von einem höheren Rauschen begleitet als in anderen Kanälen (siehe Abb. 4.56.e, f). Außerdem sollte der Abstand der Stimulationselektrode zu der Elektrode, an der das gemessene Signal abgeleitet wurde, beachtet werden. Die grobe Übersicht zeigt jedenfalls, dass die Filterschaltung, die zum Filtern des Signals in Kanal AIN3 verwendet wurde, keine sinnvollen Ergebnisse liefert (siehe Abb. 4.56.d).



Abb. 4.56: Aufgezeichnete Spannungsverläufe bei einer Vierpunktmessung mit generiertem Rechteckimpuls (Amplitude = 20 mV, Frequenz = 1 Hz) und unterschiedlichen Hochpassfiltern mit Grenzfrequenzen f_G von a) 113 Hz, b) 48Hz, c) 4,8 Hz, d) 0,5 Hz, e) 3,3 Hz f) 159 Hz

In Abb. 4.57 sind die Signalantworten an vier Eingängen zum besseren Vergleich vergrößert dargestellt. Dabei wird deutlich, dass in Kanal AIN1 (siehe Abb. 4.57.b) das beste Signal-Rausch-Verhältnis erzielt wurde. Da die Elektrode, von der dieses Signal abgeleitet wurde, auf dem MEA im Vergleich zu den anderen Elektroden sogar weiter von der Stimulationselektrode entfernt ist, wird im Weiteren angenommen, dass der zur Aufnahme dieses Signals beitragende Hochpassfilter für das gute Signal-Rausch-Verhältnis verantwortlich ist. Daraus folgt, dass ein Hochpassfilter mit einem Widerstand von 100 k Ω und einem Kondensator mit einer Kapazität von 33 nF unter den untersuchten Varianten das beste SNR erzielt. Für weitere Versuche wurde deswegen ein Hochpassfilter mit dieser Dimensionierung für alle Kanäle angefertigt.

Es sollte festgehalten werden, dass durch den Hochpassfilter die Messung an einem mit Flüssigkeit gefüllten Biochip ohne Offsetsteuerung ermöglicht wurde. Dieses Ergebnis allein zeigt den besonderen Vorteil eines Hochpassfilters bei der Messung. Allerdings ist zu beachten, dass ein derartiger Hochpassfilter niederfrequente Signalanteile extrem verzerrt. Da die aufzuzeichnenden neuronalen Signale mit Signaldauern von wenigen Millisekunden weit über der Grenzfrequenz liegen, sollte dies jedoch keine Schwierigkeiten verursachen. Die Signalverzerrung durch den Hochpassfilter wird im Zuge der software-basierten Signalkonditionierung der dargestellten Signalantworten (siehe Kap. 4.5.5) noch eingehender behandelt.

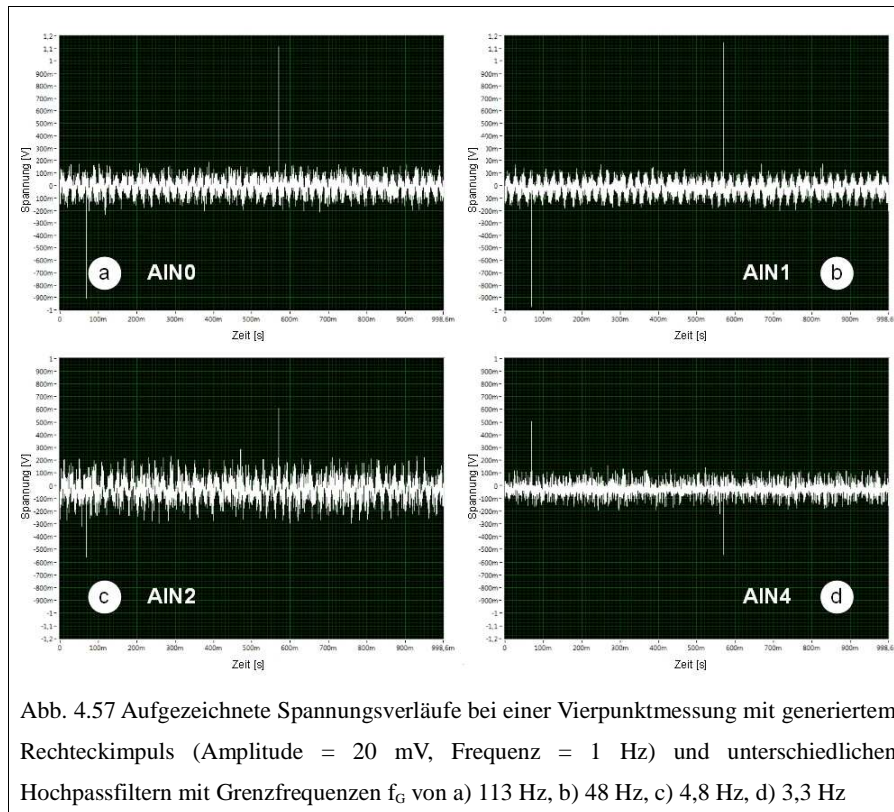


Abb. 4.57 Aufgezeichnete Spannungsverläufe bei einer Vierpunktmessung mit generiertem Rechteckimpuls (Amplitude = 20 mV, Frequenz = 1 Hz) und unterschiedlichen Hochpassfiltern mit Grenzfrequenzen f_G von a) 113 Hz, b) 48 Hz, c) 4,8 Hz, d) 3,3 Hz

4.5.5 Software-basierte Signalkonditionierung

Die gefilterten Messsignale wurden von der Datenkarte erfasst und zur Verarbeitung mit der Software Labview gespeichert. Durch die softwarebasierte Nachbearbeitung können Störsignale auch nach der Messung noch eliminiert werden. Bedingung hierfür ist, dass sie sich hinreichend von dem zu messenden Signal unterscheiden. Bei der Messung treten nun insgesamt drei Hauptformen von Störsignalen auf.

- Die erste Form, die Verschiebung des Elektrodenpotentials, wurde in Kap. 4.4.1 erläutert. Diese Störsignale können auch nicht durch eine Nachbearbeitung eliminiert werden. Deswegen wurde zur Elimination dieser Störsignale ein Hochpassfilter eingesetzt (siehe Kap. 4.5.4).
- Die zweite Form von Störsignalen ist der Netzbrumm. Dieser sollte nach Fourierentwicklung theoretisch leicht entfernt werden können. In unseren Experimenten konnte eine Verdreifachung des SNR erreicht werden. Die Nachbearbeitung mit der Software Signal Express zeigt jedoch, dass sich dadurch die Signalform komplett verändert.

- Die dritte Form von Störsignalen bilden schließlich hochfrequente Spitzen einzelner Messpunkte. Diese konnten bis rund 70% geglättet werden, ohne das gemessene Signal zu verzerren, da sich dieses ja über mehrere Messpunkte erstreckt (siehe Kap. 4.3.3).

Zur Verdeutlichung der Veränderung der Signalform bei einer softwarebasierten Nachbearbeitung zur Elimination des Netzbrumms wurden in Analogie zu Kap. 4.5.4 Signale aufgezeichnet und mit einem softwarebasierten Chebichev Bandstopfilter (50 Hz Filterfrequenz) zweiter Ordnung nachbearbeitet. Das Erregersignal war diesmal jedoch ein Spannungspuls mit einer Dauer von 500 μs und einer Amplitude von 20mV.

In Abb. 4.58.a ist das aufgezeichnete Signal an AIN3 sowie eine mit dem softwarebasierten Bandstopfilter nachbearbeitete Version desselben Signals dargestellt. Abb. 4.58.b zeigt einen Ausschnitt von 15 ms. Es ist leicht zu erkennen, dass der 50 Hz Netzbrumm durch die Nachbearbeitung erfolgreich eliminiert wurde. Dies bewirkt eine Verdreifachung des SNR. Die vergrößerte Abbildung zeigt die auftretenden Signalverzerrungen. Darauf ist zu erkennen, dass Spannungsspitzen des gemessenen und des nachbearbeiteten Spannungsverlaufs annähernd die gleiche Amplitude besitzen. Allerdings wird das erfasste Signal, das schon wegen des Hochpassfilters verzerrt erfasst wird, durch die Nachbearbeitung zusätzlich verzerrt.

Für die reine Detektion von neuronalen Signalen, insbesondere von Aktionsimpulsen, erweist sich die softwarebasierte Nachbearbeitung als besonders nützlich, um Spannungsspitzen vom Netzbrumm isoliert darstellen zu können und so im verkleinerten Maßstab nicht vom Rauschen verursachte Spannungsspitzen zu identifizieren.

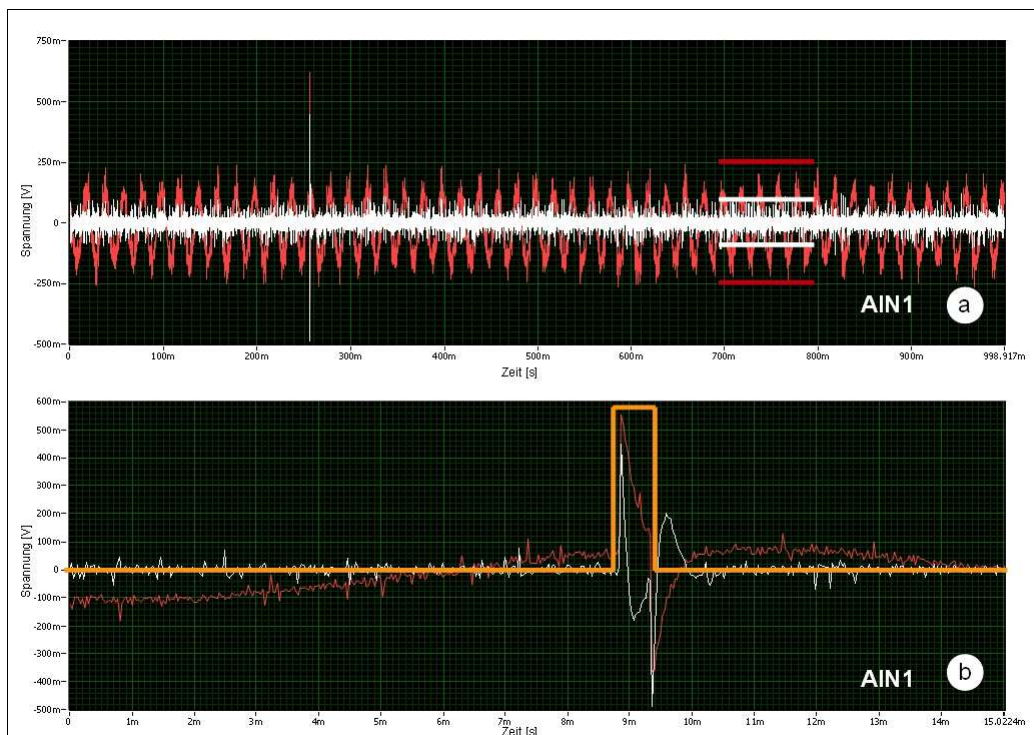


Abb. 4.58: Softwarebasierte Nachbearbeitung mit einem Bandstopfilter (weiß) einer vorgefilterten tausendfach verstärkten Signalantwort (rot) auf einen Spannungspuls mit einer Dauer von 500 μs und einer Amplitude von 20mV (orange 30-fach vergrößert). a) Rauschminimierung durch Elimination des 50 Hz Rauschens, b) Vergrößerter Ausschnitt (15 ms), resultierende Signalverzerrung

4.6 Referenzmessungen

Mit der Signalauswertung ist der Messaufbau methodisch abgeschlossen. Zum Überprüfen des gesamten Messaufbaus wurden mit einem extern eingespeisten Signal Referenzmessungen durchgeführt. Dabei wurde vor allem auch der hergestellte Biochip unter realitätsnahen Bedingungen evaluiert. Im Folgenden wurde zunächst der Einfluss des Elektrodenabstands (siehe Kap. 4.6.1) und des Elektrodendurchmessers (siehe Kap. 4.6.2) auf die Signalantwort ermittelt, und anschließend eine Messung an lebenden Neuronen durchgeführt (siehe Kap. 4.6.3).

4.6.1 Signalantwort vs. Abstand der Elektroden

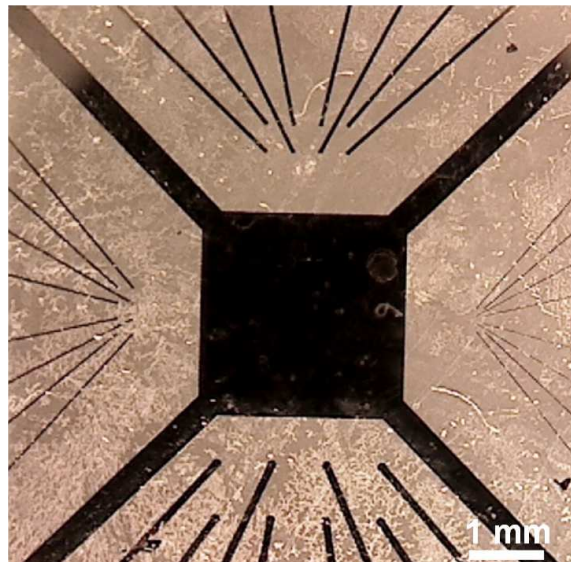


Abb. 4.59: Mikroskopische Aufnahme des prozessierten Biochips (Design 2)

Um die Amplituden der an den einzelnen Elektroden abgeleiteten Signale vergleichen zu können, wurde der Einfluss des Elektrodenabstands für ein gewähltes Elektrodenpaars auf die gemessene Spannungsamplitude ermittelt.

Dazu wurde wiederum der selbst prozessierte Biochip (siehe Abb. 4.59) mit physiologischer Kochsalzlösung befüllt und mit dem Messaufbau nach der Vierpunktmessung kontaktiert. Dabei wurde nur das Array mit den größten Elektroden (Durchmesser: 100 μm) kontaktiert. Der schematische Messaufbau ist in Abb. 4.60 dargestellt. Mit Hilfe des Signalgenerators Agilent 33220A wurden 5 unterschiedliche Impulsamplituden (20 – 100 mV) mit einer Dauer von 500 μs über eine der

Elektroden auf dem MEA eingespeist und die Signalantworten, die von allen anderen Elektroden abgeleitet wurden, nach Durchlaufen des Hochpassfilters sowie der tausendfachen Verstärkerschaltung aufgezeichnet.

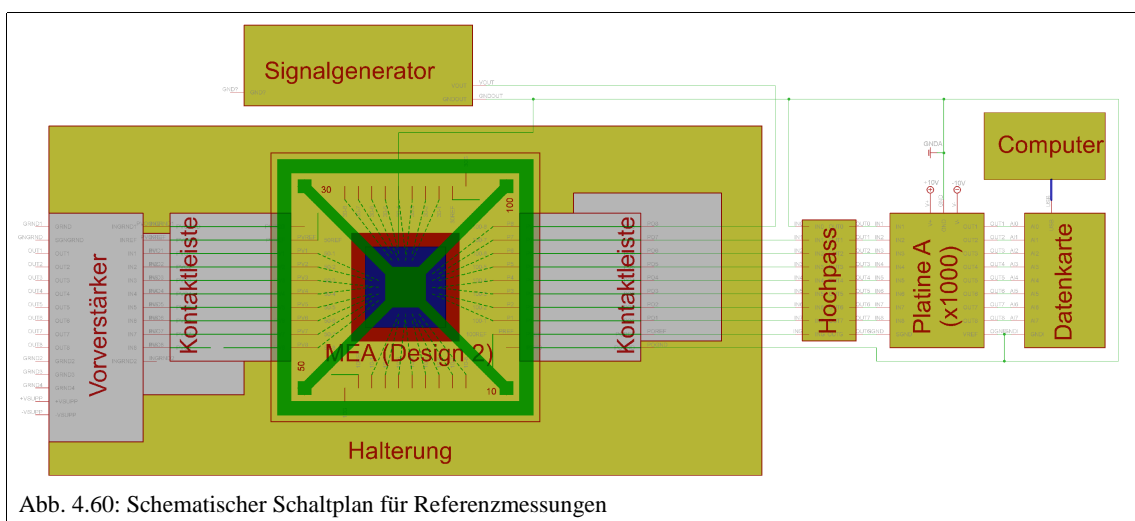


Abb. 4.60: Schematischer Schaltplan für Referenzmessungen

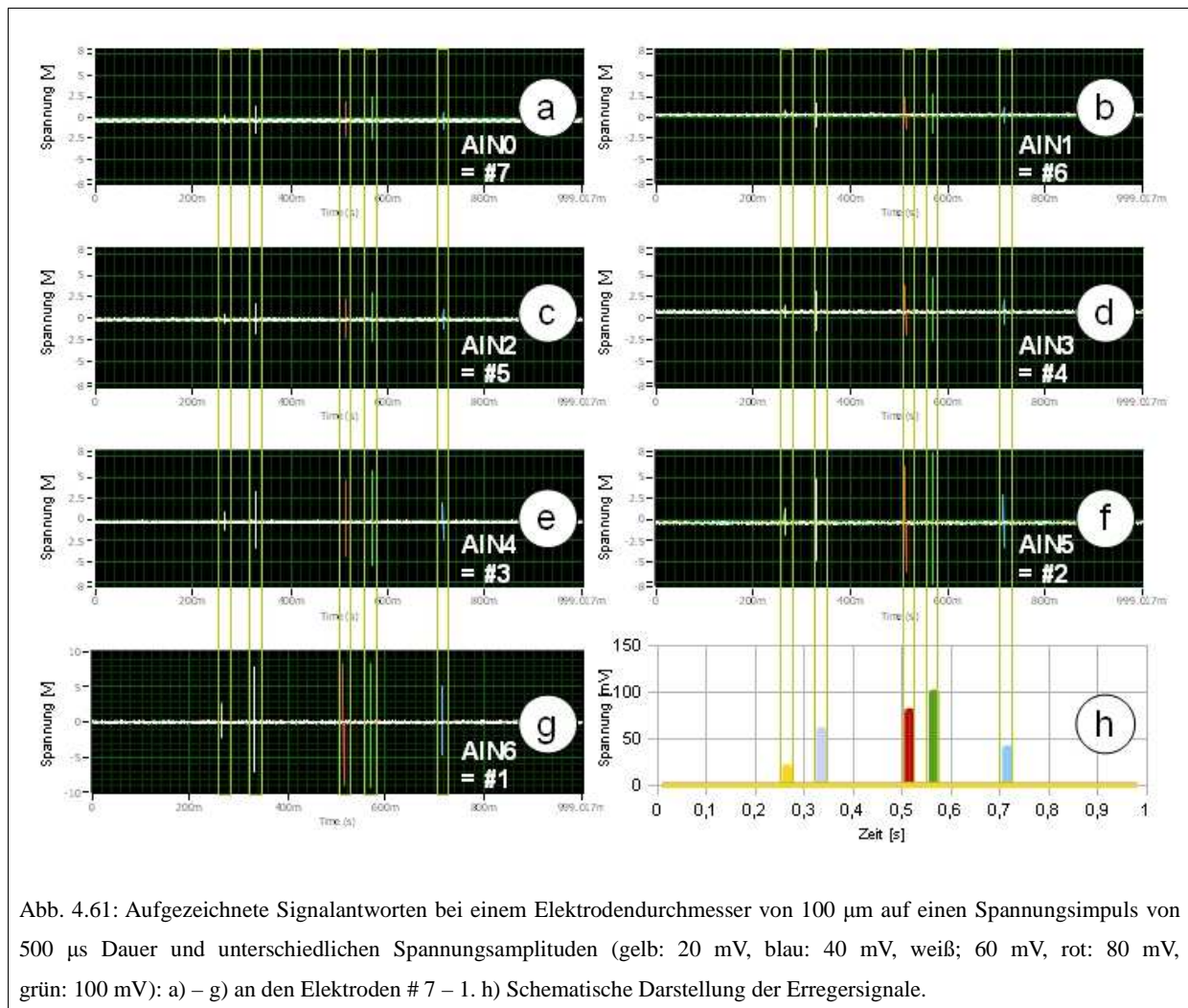


Abb. 4.61 zeigt die erfassten Signale. Dabei wurden zur besseren Übersicht in jeder der Abb. 4.61.a – g die Signalantworten der jeweiligen Elektrode (Nr. 7 – 1) bei den fünf Messungen mit unterschiedlichen eingespeisten Impulsamplituden zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gemessene Signalantwort sowohl von der Amplitude des eingespeisten Spannungsimpulses als auch von der gewählten Messelektrode abhängt. Das bedeutet, dass die Signalantwort von der Lage der Elektrode abhängt.

Die Messergebnisse wurden in Abb. 4.62.a – c zusammengefasst. Dabei ist die Belegung der Elektroden zu beachten (siehe Abb. 4.61.d). Die Messungen zeigen, dass der Zusammenhang zwischen tatsächlichem Abstand der Elektroden im Array und der Signalantwort bei weitem weniger signifikant aufscheint, als dies ursprünglich erwartet wurde (siehe Abb. 4.62.a). Dabei zeigt sich überraschenderweise, dass ein exponentieller Zusammenhang zwischen Signalantwort und der Elektrodennummer, also dem Abstand der nach Abb. 4.62.d belegten Kontaktpads und Leitungen auf dem Biochip, gefunden werden kann (siehe Abb. 4.62.b). Die Abhängigkeit von der Amplitude des Erregersignals ist dabei für alle Elektroden weitgehend linear (siehe Abb. 4.62.c).

Dieses Verhalten ist vermutlich durch die Länge und den Durchmesser der Zuleitungen für die Elektroden, die wie ein dünnes Kabel wirken, bedingt. Um Feldübertragungseffekte im restlichen Messaufbau ausschließen zu können, wurde auf einer Seite des Biochips die Stimulationselektrode durch Anlegen einer Gleichspannung von über 2 V elektrolytisch entfernt (siehe Abb. 4.62.d, e). Nach der Entfernung zeigen sich keinerlei Spannungsspitzen im

relevanten Bereich. Die Elektroden messen ein konstantes Potential. Deswegen können Feldübertragungseffekte in anderen Teilen des Messaufbaus als Fehlerquelle ausgeschlossen werden. Im Weiteren wurde davon ausgegangen, dass diese Effekte aufgrund des geringen Abstandes der Leiterbahnen für das Erregersignal und die von den Messelektroden abgeleiteten Signale auf dem Biochip entstehen und sich deswegen bei Messungen von neuronalen Signalen nur während der Stimulation auswirken.

Es sollte festgehalten werden, dass der Messaufbau befähigt, kurz (< 1 ms) andauernde Spannungsimpulse mit Amplituden < 1 mV, also auch Aktionsimpulse, von einem Elektrolyt abzuleiten und vom Rauschen unterscheidbar aufzuzeichnen. Die Signalantworten skalieren dabei linear mit der Amplitude des Erregersignals. Es wurde außerdem ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Amplitude der aufgezeichneten Signalantworten und dem Abstand zwischen den Leiterbahnen für die Messelektroden und die Stimulationselektrode festgestellt. Ein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen dem Abstand der jeweiligen Elektroden und der Signalantwort konnte jedoch nicht bestätigt werden.

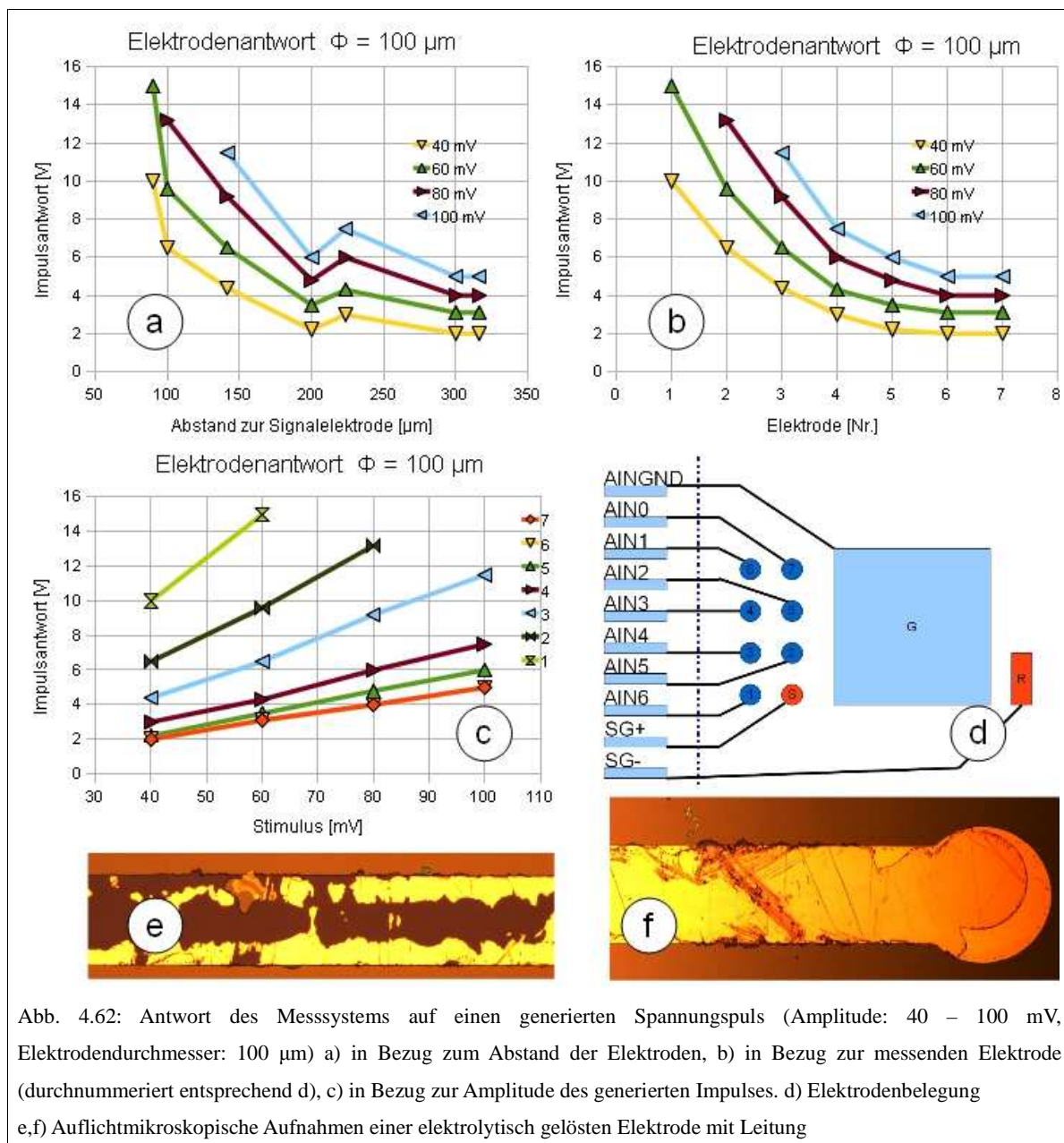


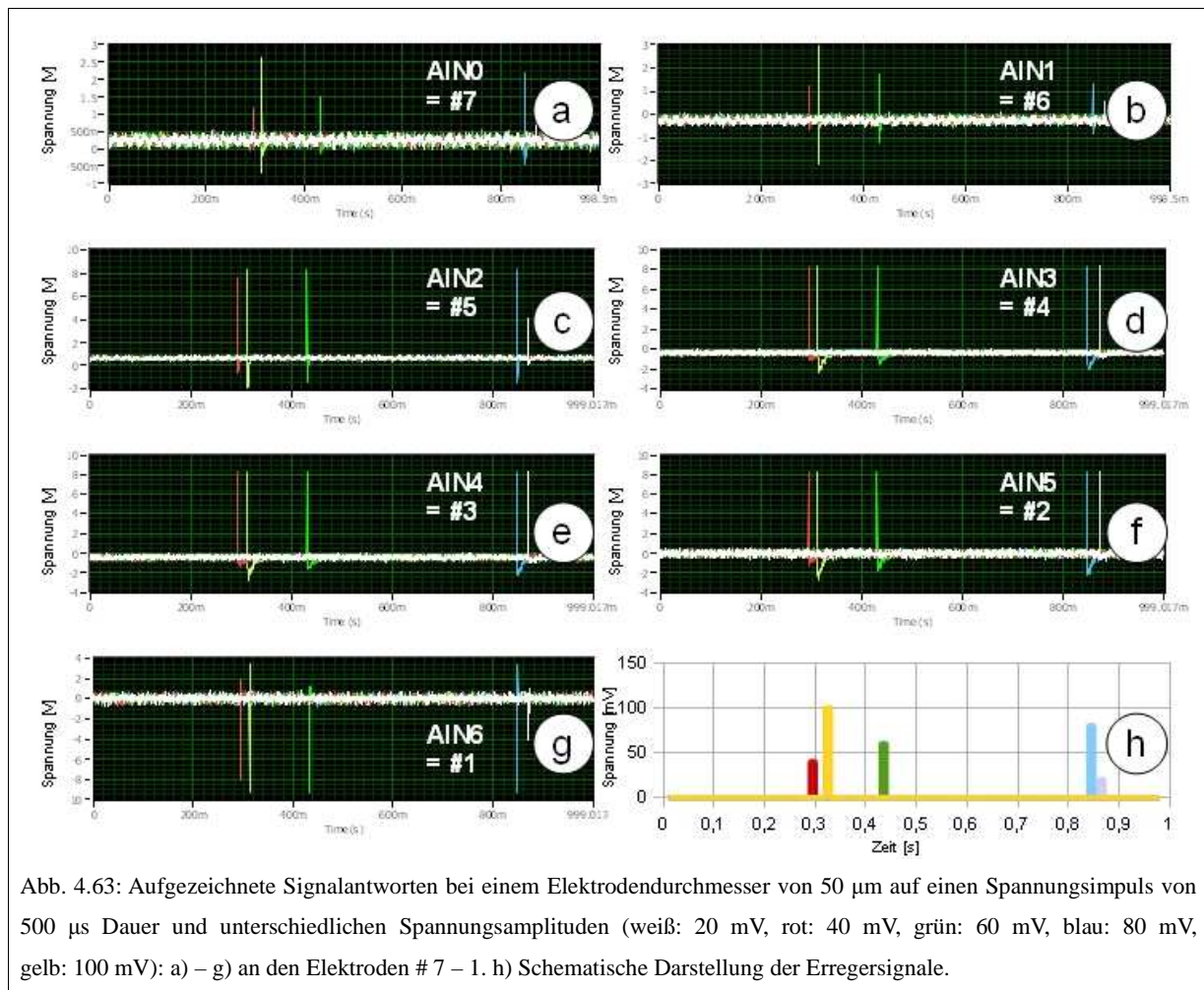
Abb. 4.62: Antwort des Messsystems auf einen generierten Spannungspuls (Amplitude: 40 – 100 mV, Elektrodendurchmesser: $100 \mu\text{m}$) a) in Bezug zum Abstand der Elektroden, b) in Bezug zur messenden Elektrode (durchnummeriert entsprechend d), c) in Bezug zur Amplitude des generierten Impulses. d) Elektrodenbelegung e,f) Auflichtmikroskopische Aufnahmen einer elektrolytisch gelösten Elektrode mit Leitung

4.6.2 Signalantwort vs. Elektrodendurchmesser

Mit dem gefertigten Messsystem war es auch möglich, den Einfluss des Elektrodendurchmessers auf die Amplitude und auf das SNR zu untersuchen. Da der prozessierte Biochip (Design 2) 4 Arrays mit verschiedenen Elektrodendurchmessern besitzt (siehe Abb. 4.59), konnten diese in einer entsprechenden Messung verglichen werden. Der Messaufbau entspricht dem in Kap. 4.6.1, nur der Biochip wurde jeweils um 90° verdreht eingesetzt. Damit wurden die Signale von Elektroden unterschiedlicher Größe abgeleitet. Das Erregersignal war wiederum ein Spannungsimpuls von 500 μ s Dauer und unterschiedlicher Amplitude (20 – 100 μ V).

Abb. 4.63 zeigt die aufgezeichneten Signalantworten bei einem Elektrodendurchmesser von 50 μ m und Abb. 4.64 die aufgezeichneten Signalantworten bei einem Elektrodendurchmesser von 30 μ m. Dabei wurden zur besseren Übersicht in jeder der Abb. 4.63.a – g und Abb. 4.64.a – g die Signalantworten der jeweiligen Elektrode (Nr. 7 – 1) bei den fünf Messungen mit unterschiedlichen eingespeisten Impulsamplituden zusammengefasst.

Im Unterschied zu den Messungen an Elektroden mit einem Durchmesser von 100 μ m (siehe Abb. 4.61) zeigen sich bei allen kleineren Elektroden asymmetrische Spannungsverläufe, die von einem wesentlich höheren Rauschen unterlegt sind. Interessant ist, dass diese Asymmetrie in allen Elektroden in Richtung positiver Spannung geht, außer bei derjenigen Elektrode, die der Stimulationselektrode am nächsten war. Um dieses Phänomen genauer zu ergründen, sollte ein Array mit mehr Elektroden aufschlussreichere Messungen der Feldverteilung zulassen.



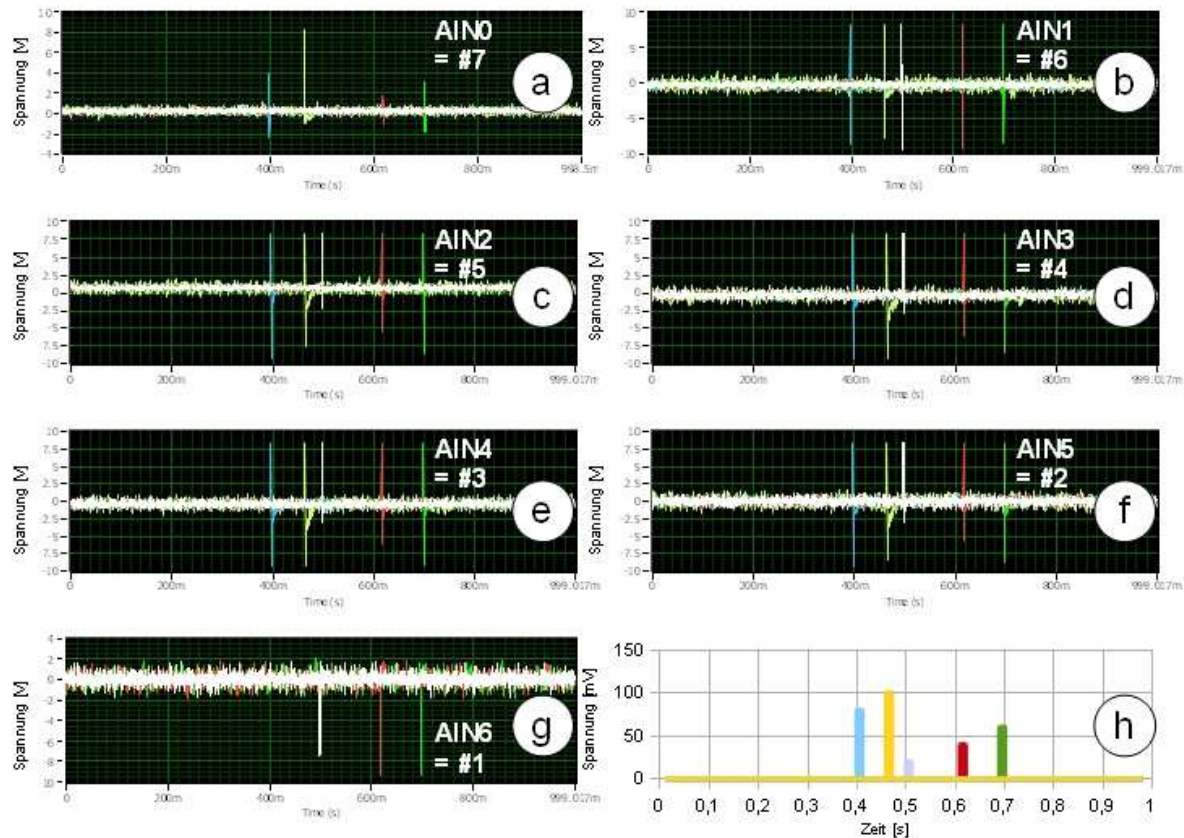


Abb. 4.64: Aufgezeichnete Signalantworten bei einem Elektrodendurchmesser von 30 µm auf einen Spannungsimpuls von 500 µs Dauer und unterschiedlichen Spannungsamplituden (weiß: 20 mV, rot: 40 mV, grün: 60 mV, blau: 80 mV, gelb: 100 mV): a) – g) an den Elektroden # 7 – 1. h) Schematische Darstellung der Erregersignale.

In Abb. 4.65 werden die aufgezeichneten Spannungsverläufe in den jeweiligen Messungen mit Erregersignalen unterschiedlicher Amplitude an Elektrode 2 zur besseren Übersicht getrennt dargestellt. Darauf ist deutlich zu erkennen, dass direkt nach der Signalantwort ein gekrümmter Spannungsverlauf aufgezeichnet wurde (siehe Abb.4.64.f), obwohl kein Signal mehr gesendet wurde. Auch dies stellt einen Unterschied zu den Messungen an den größeren Elektroden dar. Letzteres lässt auf kapazitive Entladungsvorgänge an den Phasengrenzen zwischen Elektroden und Elektrolyt schließen. Damit wäre die Abhängigkeit dieser Effekte vom Elektrodendurchmesser erklärt. Eine Elektrodenvergütung aus Titannitrid (siehe Kap. 4.2.1) kann dazu beitragen, diese Effekte zu minimieren.

Für eine genauere Analyse ist zu beachten, dass die Abstände der Elektroden auf dem Biochip in den vier Arrays mit unterschiedlichen Elektrodendurchmessern im selben Maßstab gewählt wurden. Für einen direkten Vergleich des Durchmessers des gewählten Elektrodenpaars bei gleichem Abstand bieten sich Abb. 4.61.f und Abb. 4.63.c an. Aus dem Vergleich der Amplituden der Signalantworten auf das gleiche Erregersignal bei gleichem Abstand und halbem Elektrodendurchmesser (100 bzw. 50 µm) ergibt sich, dass die gemessene Spannung mit den kleineren Elektroden rund ein achtel höher war. Dabei ist zu beachten, dass die Messungen an den kleineren Elektroden mit Erregeramplituden größer 40 mV nicht zum Vergleich herangezogen werden konnten, da sie außerhalb des Auflösungsbereichs lagen.

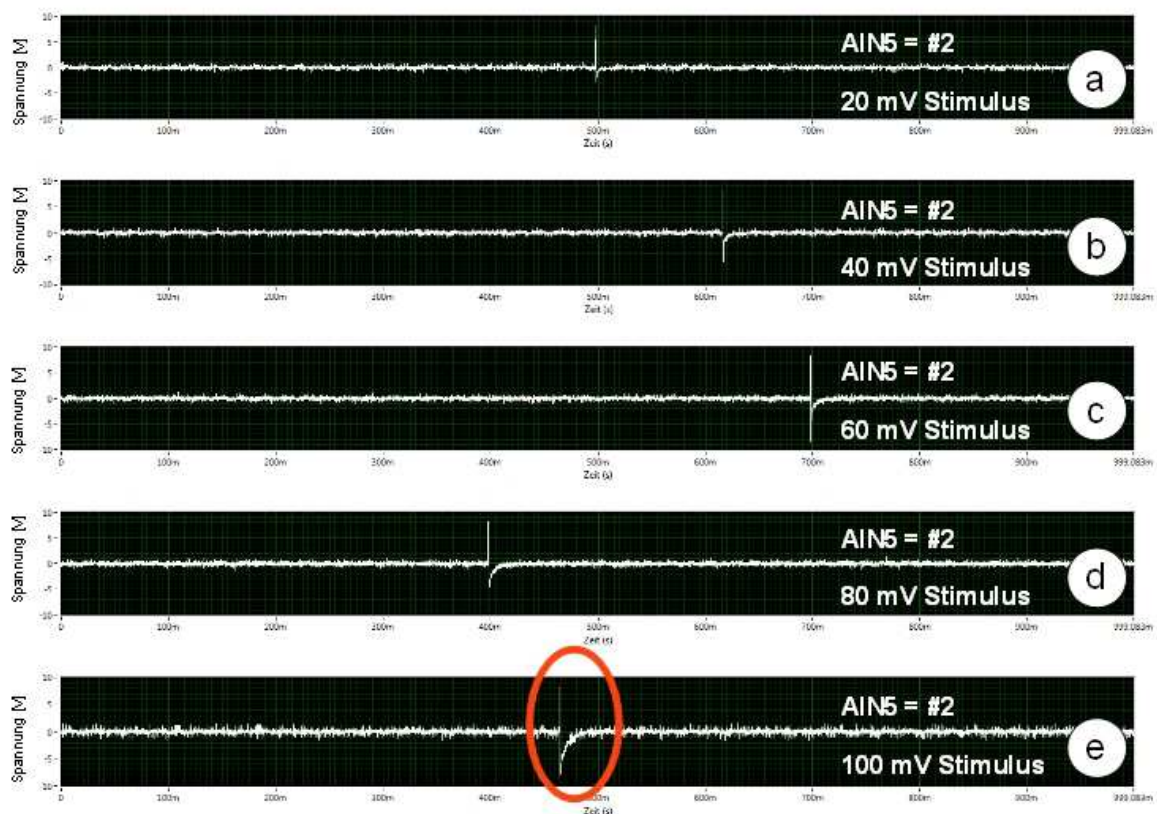


Abb. 4.65: Aufgezeichnete Signalantworten an Eingang AIN5 bei einem Elektrodendurchmesser von 50 μm auf einen Spannungsimpuls von 500 μs Dauer und unterschiedlichen Spannungsamplituden (a) 20 mV, b) 40 mV, c) 60 mV, d) 80 mV, e) 100 mV).

Der Auflösungsbereich in der gewählten Anordnung ist zu klein, um Signalantworten sinnvoll ableiten zu können. Bei minimaler Stimulation (20 mV) ist ein Großteil der Elektroden bereits zu stark geladen. Um kleinere Spannungsunterschiede zu erzeugen, ließe sich ein Spannungsteiler einsetzen. Aufgrund der bei Elektrodendurchmessern kleiner 100 μm aufgetretenen unerwünschte Effekte, wurde jedoch darauf verzichtet. Es liegt die Vermutung nahe, dass diese Effekte durch eine Elektrodenvergütung beseitigt werden können. Für aufschlussreichere Analysen ist ein Messaufbau mit wesentlich mehr Elektroden notwendig.

Als finaler Test wurde mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Messaufbau ein Versuch an lebenden Neuronen durchgeführt. Dazu wurde aus den beschriebenen Gründen auf Elektroden mit einem Durchmesser von 100 μm zurückgegriffen.

4.6.3 Messung an lebenden Neuronen

Um Signale von lebenden Neuronen ableiten zu können, wurden gemäß dem in Kap. 3.1 beschriebenen Verfahren Neuronen auf dem selbst prozessierten Biochip (Design 1, siehe Abb. 4.66) ausgesät. Anschließend wurden sie 5 Tage lang kultiviert und in einer speziellen Transportnährflüssigkeit zum Messaufbau transferiert, um diesen noch anpassen zu können.

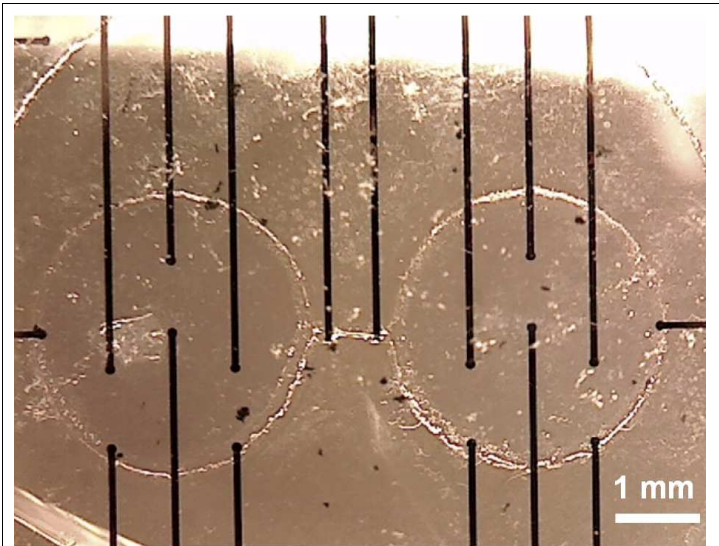


Abb. 4.66: Lichtmikroskopische Aufnahme eines prozessierten Biochips (nach Design 1) mit strukturierter Zellkulturkammer und 100 µm durchmessenden Elektroden

Der Messaufbau ist in Abb. 4.67 dargestellt. Die Zellkulturkammer war massfrei. Die lebenden Zellen wurden nicht elektrisch mit dem Signalgenerator stimuliert, sondern mit Nikotin-Lösungen verschiedener Konzentration zur chemischen Stimulation der Synapsen (siehe Kap. 2.1.2). Abb. 4.68 zeigt die Elektrodenbelegung.

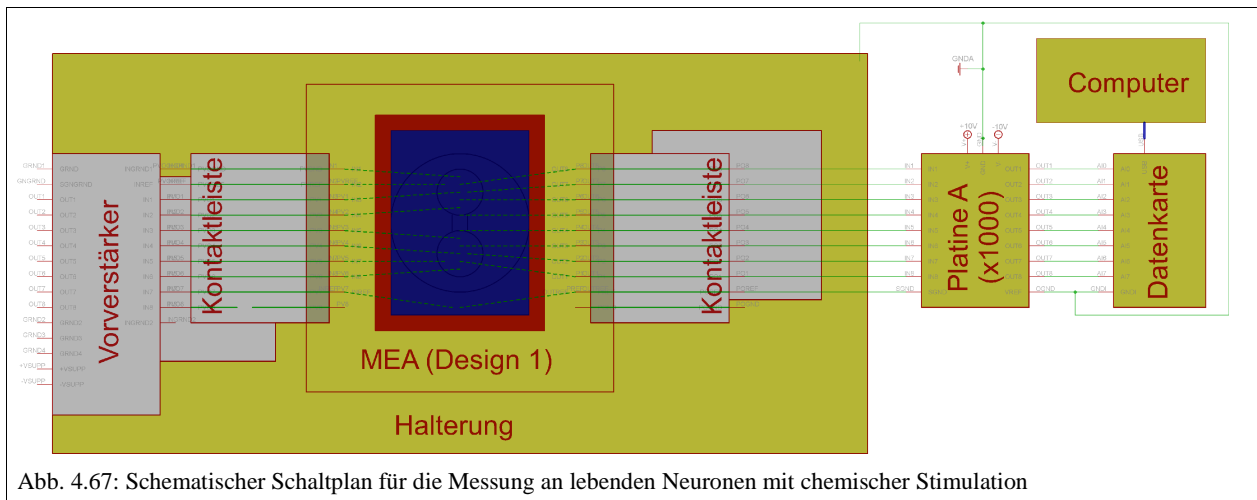


Abb. 4.67: Schematischer Schaltplan für die Messung an lebenden Neuronen mit chemischer Stimulation

Die aufgezeichneten Spannungsverläufe an den Elektroden (siehe Abb. 4.69) zeigen ein Rauschen mit einer Amplitude von rund 20 mV, was 20 µV an den Elektroden entspricht. Des weiteren sind Spannungsspitzen von bis zu 70 mV bzw. 70 µV mit einer Dauer von bis zu einer Millisekunde zu sehen. Diese Spannungsspitzen wurden in einer Nährlösung mit 20 µM Nikotin (siehe Abb. 4.69.c) wesentlich häufiger aufgezeichnet als mit 10 (siehe Abb. 4.69.b) oder 5 µM Nikotin.

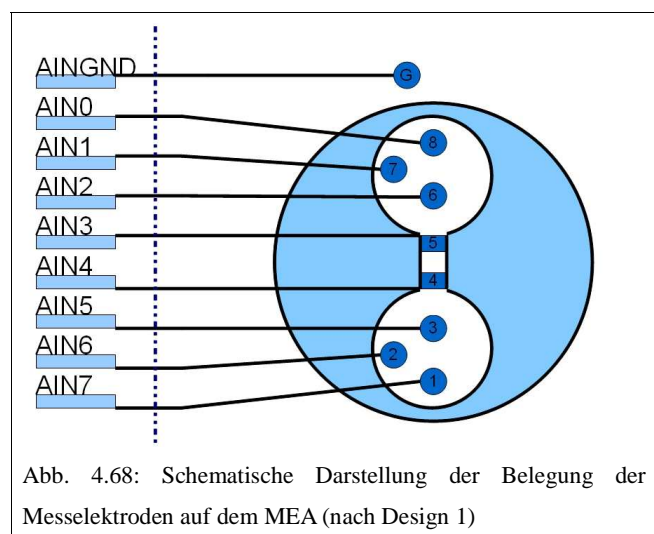
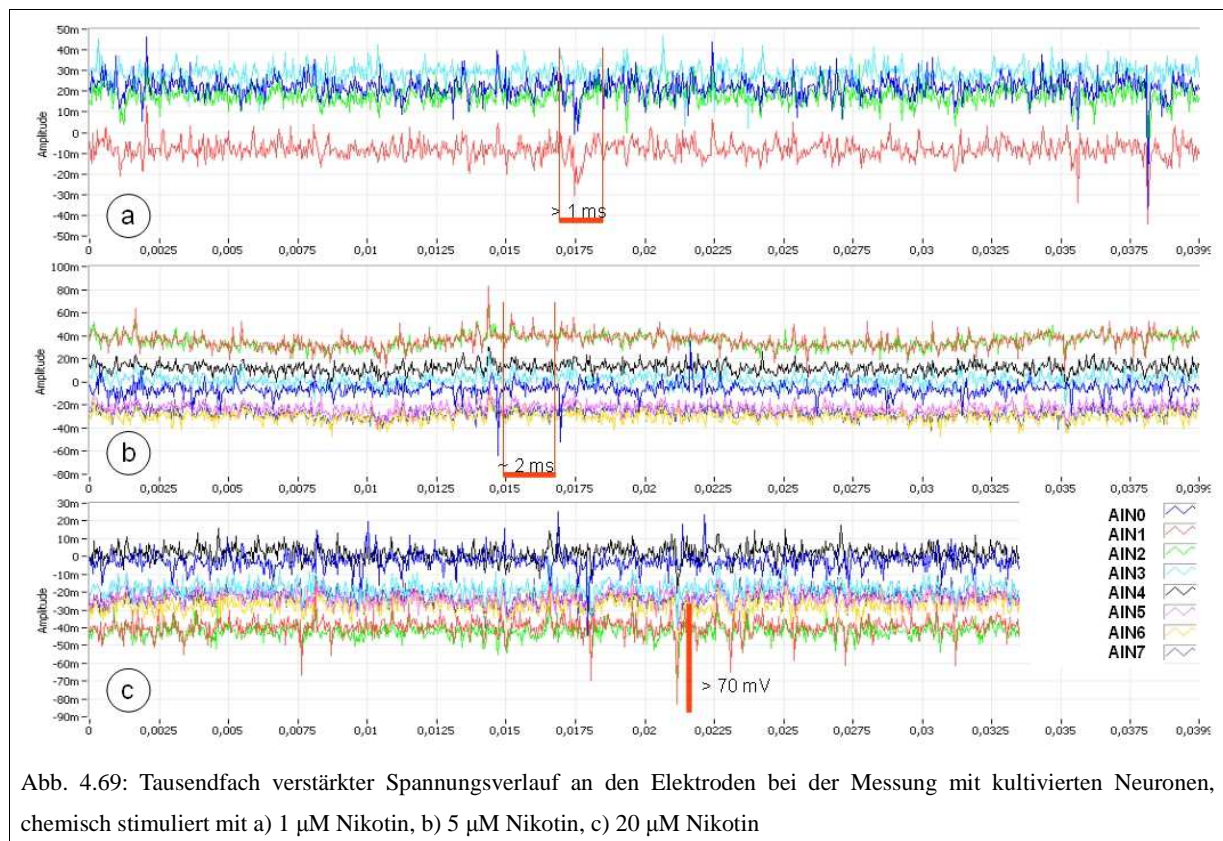
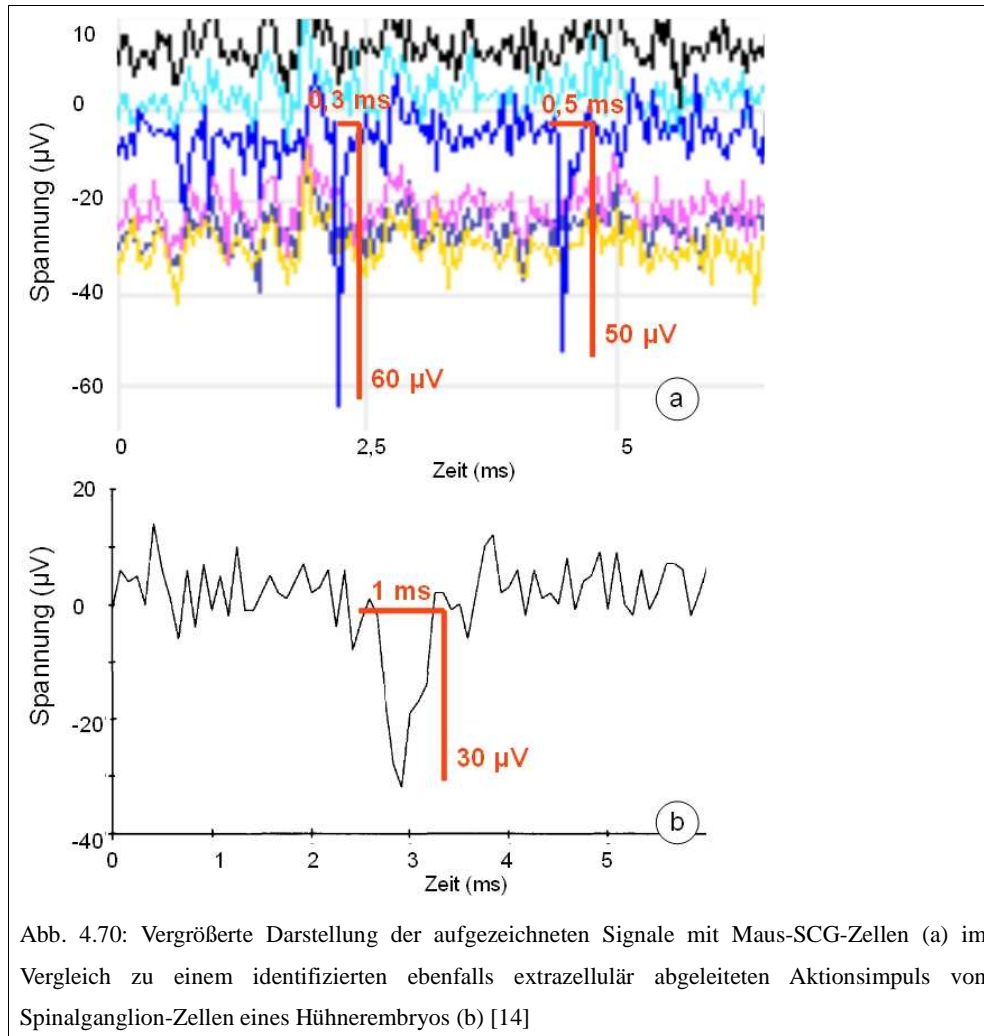


Abb. 4.68: Schematische Darstellung der Belegung der Messelektroden auf dem MEA (nach Design 1)



Da ohne lebende Zellen bei gleicher Messkonfiguration keine derartigen Spannungsspitzen aufgezeichnet wurden (siehe Kap. 4.4.1), wurde angenommen, dass diese elektrischen Signale von der biologischen Substanz erzeugt wurden. Die Dauer von bis zu einer Millisekunde Pulsbreite, die Signalform, die auftretenden Pausen (siehe Refraktärzeit) und die Verkürzung dieser Pausen bei erhöhter Reizung wären charakteristisch für Aktionsimpulse. In Abb. 4.70 sind zum Vergleich die als Aktionsimpulse in Frage kommenden Signale einem identifizierten neuronalen Signal von Spinalganglion-Zellen eines Hühnerembryos, die mit einer vergleichbaren Messmethode aufgenommen wurden [33], gegenübergestellt. Dabei sind die genannten Ähnlichkeiten zu erkennen. Die Unterschiede in den Amplituden und Pulsdauern sind auf die unterschiedlichen Zelltypen zurückzuführen. Das durchschnittliche Signal-Rausch-Verhältnis von 1:3 wäre typisch für diese Messung.

Für systematische Vergleiche empfiehlt sich eine elektrische Stimulation. So wären in einem aufgezeichneten Spannungsverlauf jeweils nach einem Stimulationsimpuls die Aktivitäten der Neuronen an den Elektroden zu sehen. Erste Versuche zeigten, dass für eine elektrische Stimulation der Neuronen ohne Hochpassfilter der Masseanschluss der Zellkulturkammer weiter optimiert werden muss (siehe Kap. 4.4). Da ein Hochpassfilter die Signalform verzerrt (siehe Kap. 4.5.6), wurde zur Identifizierung der Biosignale auf die massefreie Messung zurückgegriffen. Dabei zeigte sich, dass es mit lebenden Zellkulturen auf den Elektroden zu Spannungsänderungen kommt, die bei unbewachsenen Elektroden nicht auftreten und die beschriebenen Ähnlichkeiten mit den erwarteten neuronalen Signalen aufweisen. So wurden im Rahmen dieser Arbeit die Grundlagen gelegt um neuronale Signale extrazellulär mit Hilfe von Elektrodenarrays abzuleiten und zur späteren Auswertung aufzuzeichnen.



5. Resümee

Das Ziel dieser Arbeit war der Aufbau und die Evaluierung eines Biochip-basierten Messsystems für die Erfassung elektrischer Signale von neuronalen Zellkulturen. Im ersten Schritt wurde ein geeigneter Herstellungsprozess für einen problemorientierten Biochip mit Hilfe der Halbleitertechnologie entwickelt. Im zweiten Schritt wurde ein geeigneter Messaufbau zur elektrischen Ableitung und Analyse neuronaler Signale vom selbst entwickelten Biochip hergestellt und evaluiert.

Zuerst wurde eine eingehende Überprüfung der einsetzbaren Materialien auf Biokompatibilität (siehe Kap. 4.1.1) nach dem bekannten Verfahren zur Gewinnung und Kultivierung von Maus-SCG-Zellen (siehe Kap. 3.1) durchgeführt. Für die Herstellung des Biochips wurden 2 Elektrodendesigns entwickelt. Nach einer notwendigen Prozessoptimierung (siehe Kap. 4.1.2 und Kap. 4.1.3) konnte erfolgreich ein Prozessablauf (siehe Kap. 3.2.2) zur Fertigung eines Biochips mit Hilfe plasmaunterstützter Beschichtungs- und Ätzverfahren (siehe Kap. 2.3.2) und lithographischer Strukturierung (siehe Kap. 2.3.1) ausgearbeitet werden (siehe Kap. 4.1.4). Dazu wurde Gold als Leitermaterial und Siliziumnitrid als Isolationsmaterial eingesetzt. Zur verbesserten Haftung der Elektroden auf dem Glassubstrat wurde eine Haftschrift für die Elektroden (siehe Kap. 3.2.3) aus Chrom oder aus Titan eingesetzt. Die Ätzdauer der Isolationsschicht wurde auf 12 Minuten angepasst, damit die Elektroden auch wirklich frei liegen. Die beiden Elektrodendesigns wurden erfolgreich prozessiert und elektrisch charakterisiert. Zur Aufnahme des neurobasalen Nährmediums wurden maßgefertigte Zellkulturkammern hergestellt. Es wurden erfolgreich Gussformen aus Aluminium angefertigt (siehe Kap. 3.2.4), mit deren Hilfe Zellkulturkammern aus biokompatiblen Silikonkautschuk gegossen wurden. Anschließend wurden die Kulturkammern über ein weiteres entwickeltes Verfahren (siehe Kap. 3.2.5) wasserdicht mit dem Mikroelektrodenarray verbunden (siehe Kap. 4.2.3).

Außerdem wurde mit der Entwicklung einer Elektrodenvergütung und eines funktionalisierten Zellkulturkammerbodens der Grundstein für die Prozessierung problemspezifischer Biochips gelegt. Zur Herstellung einer Elektrodenvergütung aus Titannitrid hat sich ein 20 Min. Sputterprozess mit 50 W Leistung als geeignet erwiesen (siehe Kap. 4.2.1). Damit die Elektroden direkt in Ausbreitungsrichtung des Aktionsimpulses liegen, wurden Mikrokanäle zwischen zwei größeren Kulturkammern hergestellt. Es wurden erfolgreich Mikrokanäle lithographisch auf den Elektrodenarrays strukturiert (siehe Kap. 4.2.2), welche den Anforderungen genügen, um axonale Aktivitäten separiert abzuleiten. Das Wachstum von Zellen auf dem strukturierten Zellkulturkammerboden konnte bestätigt werden, sodass dieses neue Konzept für folgende Forschungsarbeiten zur Verfügung steht.

Eine weitere Aufgabenstellung war der Aufbau eines kompletten Messsystems mit automatisierter Datenerfassung. Dabei sollten die schwachen neuronalen Signale auch verstärkt werden. Zunächst wurde ein Konzept für die Kontaktierung des Biochips erarbeitet (siehe Kap. 3.3.1) und eine Halterung mit Kontaktstiften angefertigt (siehe Kap. 3.3.2). In ersten Versuchen wurde ein unmittelbar an die Kontaktierung anschließender Vorverstärker mit einem Verstärkungsfaktor von zehn eingesetzt, der direkt mit dem Biochip verbunden wurde, damit sofort nach der Ableitung möglichst rauschfrei Signale verstärkt werden können (siehe Kap. 4.3.4). Danach wurde das Signal mit einem selbst entwickelten Hauptverstärker mit variablem Verstärkungsfaktor zusätzlich verstärkt, mit einer Datenkarte digitalisiert und mit dem Computer erfasst. Zum Testen wurde ein mikroelektronischer Biosignalgenerator eingesetzt, der ähnlich zu realen Probe mit 1 mV maximaler Amplitude neuronale Signale wie z.B. EPSPs ausgibt. Ein direkter Vergleich zwischen Messungen mit einer zweistufigen ($\times 10 \times 100$) und einer

einstufigen (x1000) Verstärkerschaltung eines von einem Biosignalsimulator generierten Signals zeigte jedoch, dass der Vorverstärker gar nicht notwendig ist (siehe Kap. 4.3.6). Auf Basis dieser Erkenntnis ist es in Zukunft möglich eine optimierte Version des Messsystems mit breiteren Abständen der Kontaktstifte und einer weitaus weniger komplexen Kontakthalterung zu verwenden, um die Kontaktierung der Biochips zu erleichtern.

Dieses Messsystem wurde ausführlich evaluiert und Maßnahmen zur Rauschreduktion implementiert. Die einzelnen Komponenten des Messsystems wurden in einem modularen Aufbau (siehe Kap. 3.5.1) getestet. Es zeigt sich, dass der gewählte Verstärker (siehe Kap. 3.4.1) nach eingehenden Funktionstests (siehe Kap. 4.3.1) und sachgemäßer Verschaltung auf einer Platine mit acht Kanälen (siehe Kap. 3.4.2) erfolgreich zur Identifizierung des vom Biosignalsimulator generierten Aktionsimpulses eingesetzt werden konnte. Dabei empfiehlt sich ein Verstärkungsfaktor von tausend, um Signale mit Amplituden < 1 mV vom Rauschen klar unterscheidbar aufnehmen zu können (siehe Kap. 4.3.5). Die zeitliche Auflösungsgrenze der Signalerfassung mit der Datenkarte (siehe Kap. 3.5.3) liegt bei etwa 100 ms (siehe 4.3.3), was für die Ableitung neuronaler Aktivität ausreichend ist. Durch eine höhere Abtastrate in diesem Bereich könnte noch eine erhebliche des SNRs erzielt werden. Das Oszilloskop kam für die Messungen nur bedingt als Vergleichsinstrument in Frage, da es ein zusätzliches Massepotential zum Massepunkt hinzufügt, was das Signal-Rausch-Verhältnis signifikant verschlechtert. Dabei traten Effekte ähnlich den sprunghaften Störsignalen bei der zweistufigen Verstärkerschaltung mit zwei Spannungsquellen auf (siehe Kap. 4.5.1).

Es wurden auch Rauschquellen und Möglichkeiten zur Rauschreduktion untersucht. Eine wesentliche Verbesserung wurde mit einem Tiefpassfilter am Verstärkerausgang (siehe Kap. 4.5.3) sowie einem Hochpassfilter (siehe Kap. 3.4.3) am Verstärkereingang (siehe Kap. 4.5.4) erzielt. Bei der Dimensionierung ist jedoch darauf zu achten, dass ein überdimensionierter Hochpassfilter vor der Verstärkerschaltung das gemessene Signal grob verzerrt. Eine softwarebasierte Signalkonditionierung verzerrt das Signal zusätzlich (siehe Kap. 4.5.5), weshalb darauf im weiteren Verzichtet wurde. Auf eine Schirmung des Messaufbaus (siehe Kap. 4.5.2) konnte im gesamten Ablauf verzichtet werden, da keine signifikante Verbesserung des SNRs erwartet wurde. Ein Vergleich von Dreipunktmessung (siehe Kap. 4.4.2) und Vierpunktmessung (siehe Kap. 4.4.3) zeigte außerdem, dass Letztere ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis liefert. Um die Offsetspannung an den Verstärkereingängen minimal zu halten, empfehlen sich bipolare Ableitungen. Allerdings kann dies nur vermutet werden, da die Verschaltung der Verstärkerplatinen eine bipolare Ableitung nicht gestattet.

Die fertigen Messsysteme mit selbst gefertigten Biochips wurden mit Referenzmessungen evaluiert und schließlich für die Messung an lebenden Neuronen eingesetzt. Wenn die Zellkulturkammer auf Masse gelegt wurde, kam es zu einem Drift des Messsignals (siehe Kap. 4.4.1), welcher über die Phasengrenzeneffekte erklärt werden kann (siehe Kap. 2.2.2). Es muss angenommen werden, dass der verwendete Signalgenerator (siehe Kap. 3.5.2) übers Netz geerdet ist (siehe Kap. 4.3.1) und die Masse des Signalgenerators erst entkoppelt werden müsste. Außerdem mussten mit dem Signalgenerator erzeugte Spannungen geteilt werden, um bei einem Verstärkungsfaktor von Tausend mit dem gewählten Messaufbau noch aufgelöst werden zu können (siehe Kap. 4.3.2). Die tatsächlich am Verbraucher anliegende Spannung variiert mit dem Widerstand des Verbrauchers, was insbesondere für Referenzmessungen am Biochip ungünstig ist, da die Absolutamplituden der Signalantworten wenig Aussagekraft besitzen.

Die ersten Ergebnisse aus den Messungen bezüglich Abstand (siehe Kap. 4.6.1) und Größe der Elektroden (siehe Kap. 4.6.2) lassen jedoch vermuten, dass für eine ortsgetreue Auflösung der generierten und mit Hilfe des Biochips

abgeleiteten Signale die Isolationsschicht etwas dicker gewählt werden sollte. In folgenden Versuchen sollte die Antennenwirkung der Zuleitung durch symmetrische Stimulation, dünnere Zuleitungen sowie größere Abstände der Zuleitungen minimiert werden. Eine abschließende Messung von AIs von lebenden Neuronen mit Hilfe von chemischer Stimulation (siehe Kap. 4.6.3) liefert erste Hinweise darauf, dass erfolgreich neuronale Aktivität abgeleitet werden konnte. Jedenfalls entsprechen die gemessenen Signale in Form und Refraktärzeit dem erwarteten Bild von Aktionsimpulsen (siehe Kap. 2.1.1). Die an den verschiedenen Elektroden gemessenen Signale könnten auch als Aktivitätsmuster interpretiert werden (siehe Kap. 2.1.2).

Durch diese Messung konnte erfolgreich die Funktionsweise des Biochips als auch des gesamten Messaufbaus demonstriert werden. Es ist jedoch kritisch anzumerken, dass das Ergebnis mit 8 messenden Elektroden noch nicht signifikant genug für genauere Aussagen ist. Um reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten, und die gemessenen Signale so als Aktionsimpulse identifizieren zu können, sollte in weiteren Versuchen eine elektrische Stimulation der neuronalen Kulturen ermöglicht werden. Auch sollte auf eine andere Dimensionierung der Mikroelektrodenarrays (siehe Kap. 3.2.1) zurückgegriffen werden, da die gewählte MEA-Dimensionierung ja nur für Referenzmessungen entworfen wurde.

In dieser konnte Arbeit erfolgreich ein komplettes System zur Ableitung und Aufzeichnung neuronaler Signale entwickelt werden. Dabei wurden wesentliche Zusammenhänge aufgezeigt und grundlegende Erkenntnisse für die Herstellung eines problemorientierten Messsystems gewonnen. So bietet diese Arbeit das Potential für zukünftige Entwicklungen.

6 Quellenverzeichnis

[1] H. Pfützner: *Angewandte Biophysik*

Springer-Verlag, 2003, 4 – 17

[2] T. Akkermann: *Physikalische Biochemie*

Springer-Lehrbuch, 1992, 90 – 99

[3] F. van den Berg: *Angewandte Physiologie: Organsysteme verstehen und beeinflussen*

Georg Thieme Verlag, 2005, 13 – 25

[4] D. E. Goldman: *Potential, impedance, and rectification in membranes*

Journal of General Physiology 27, 1943, 37 – 60

[5] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*

Georg Thieme Verlag, 1960, 441 – 458

[6] A. L. Hodgkin, A. F. Huxley: *A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve*

Journal of Physiology, Ausgabe 117, 1952, 500–544

[7] F. Rosenblatt: *The perceptron: a probabilistic model for information storage and organization in the brain*

Psychological Reviews, Ausgabe 65, 1958, 386 – 408

[8] R. Schrott, A. Keue, J. Taube, D. Schmuck, H. Beikirch, W. Baumann, E. Schreiber: *Real-time Data Analysis of Action Potentials*

International Conference on Computational Intelligence for Measurement Systems and Applications, 2004, 26 – 29

[9] S. Schmitz: *Der Experimentator – Zellkultur*

Spektrum Akademischer Verlag, 2008, 130 – 140

[10] D.A. Stenger, T. M. McKenna: *Enabling Technologies for Cultured Neural Networks*

Academic Press, 1994, 125 – 144

[11] G. Xiang, L. Pan, L. Huang, Z. Yu, X. Song, J. Cheng, W. Xing, Y. Zhou: *Microelectrode array-based system for neuropharmacological applications with cortical neurons cultured in vitro*

Biosensors and Bioelectronics, Ausgabe 22, 2007, 2478 – 2484

[12] R. Weis, P. Fromherz: *Frequency dependent signal transfer in neuron transistors*

Physical Review E, Ausgabe 55, 1997, 877 – 899

[13] *EcoMEA-Glass User Manual*

© by Multi Channel Systems GmbH

[14] M. Bove, M. Grattarola, S. Martinoia, G. Verreschi: *Interfacing cultured neurons to planar substrate microelectrodes: characterization of the neuron-to-microelectrode junction*

Bioelectrochemistry and Bioenergetics Ausgabe 38, 1995, 255 – 265

[15] B. J. Dworak, B. C. Wheeler: *Novel MEA platform with PDMS microtunnels enables the detection of action potential propagation from isolated axons in culture*

Lab Chip, Ausgabe 9, 2009, 404 – 410

[16] J. R. Sheats, B. W. Smith: *Microlithography - Science and Technology*

Marcel Dekker, 1998, 43 – 55

[17] G. Jing, Y. Yao, M. Gnerlich, S. Perry, S. Tatic-Lucic: *Towards a multi-electrode array (MEA) system for patterned neural networks*

Procedia Chemistry, Ausgabe 1, 2009, 329 – 332

[18] *Casy® Model DT – Cell Counter Operator Manual*

© by InnovatisGroup AG

[19] *Product Data Sheet Glass Cover Slides, siliconized*

© by Greiner Bio-One International AG

[20] *Thermo Scientific Heraeus® BBD6220 CO2-Inkubatoren Product Information*

© by Thermo Fisher Scientific Incorporation

[21] P. Scholze, A. Ciuraszkiewicz, F. Groessl, A. O.-Urtreger, J. M. McIntosh, S. Huck: *$\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Early Postnatal Mouse Superior Cervical Ganglion*

Developmental Neurobiology, Ausgabe 71, 2011, 390 – 399

[22] P. V. Kola, S. Daniels, D. C. Cameron, M. S. J. Hashmi: *Magnetron sputtering of tin protective coatings for medical applications*

Journal of Materials Processing Technology, Ausgabe 56, 1996, 422 – 430

[23] K. C. Tang, E. Liao, W. L. Ong, J. D. S. Wong, A. Agarwal, R. Nagarajan, L. Yobas: *Evaluation of bonding between oxygen plasma treated polydimethyl siloxane and passivated silicon*

Journal of Physics: Conference, Ausgabe 34, 2006, 155 – 161

[24] *Information about Dow Corning® Brand Silicone Encapsulants*

© by Dow Corning Corporation.

[25] W. Schrott, M. Svoboda, Z. Slouka, M. Průibyl, D. Šnita: *PDMS microfluidic chips prepared by a novel casting and pre-polymerization method*

Microelectronic Engineering, Ausgabe 87, 2010, 1600 – 1602

[26] *Adhesion Results-Shear Analysis*

© by MicroChem Corporation

[27] *Feinraster- und Doppelhubstifte zur Prüfung von Feinraster-Komponenten F109*

© by Feinmetall GmbH

[28] *8-Channel Miniature Preamplifier Manual MPA8I*

© by Microchannel Systems GmbH

[29] *MT Series Compact Dovetail Linear Stages*

© by Newport Corporation

[30] C.H. Chen, D.J. Yao, S.H. Tseng, S.W. Lu, C.C. Chiao, S.R. Yeh: *Micro-multi-probe electrode array to measure neural signals*

Biosensors and Bioelectronics, Ausgabe 24, (2009), 1911 – 1917

[31] *Digitally Controlled Programmable-Gain Instrumentation Amplifier PGA202/203*

© by Burr-Brown Corporation

[32] *Agilent 33220A 20 MHz Function /Arbitrary Waveform Generator*

© by Agilent Technologies Incorporation

[33] *MEA – SG MEA Signal Generator*

© by Multi Channel Systems MCS GmbH,

[34] *NI USB-621x Specifications*

© by National Instruments Corporation

[35] *Digital Storage Oscilloscopes TDS1000B Series TDS-2000B Series*

© by Tektronix Incorporation

[36] C. E. Shannon: *Communication in the Presence of Noise*

Proceedings of the IEEE, Ausgabe 86, 1998, 447 – 457

[37] A. van Bergen, T. Papanikolaou, A. Schuker, A. Möller, B. Schlosshauer: *Long-term stimulation of mouse hippocampal slice culture on microelectrode array*

Brain Research Protocols, Ausgabe 11, 2003, 123 – 133

[38] M. Hufnagl: *Time resolved transepithelial impedance spectroscopy of caco 2 monolayers relying on lithographically patterned basolateral cell arrays*

Institut für Physik Wien, Diplomarbeit, 28 – 37

[39] AZ 5214 E Image Reversal Photoresist Product Datasheet

© by Clariant AG

[40] P. Goudeau, N. Tamura, G. Parry, J. Colin, C. Coupeau, F. Cleymand, H. Padmore: *Strain mapping on gold thin film buckling and silicon blistering*

Materials Research Society Symposia Proceedings, Ausgabe c, 2005, O10.4.1

[41] I. W. Rangelow, H. Löschner: *Reactive ion etching for microelectrical mechanical system fabrication*

Journal of vacuum science and technology B 13(6),1995, 2394 – 2399

[42] U. Egert, B. Schlosshauer, S. Fennrich, W. Nisch, M. Fejtl, T. Knott, T. Müller, H. Hämmerle: *A novel organotypic long-term culture of rat hippocampus on substrate-integrated multielectrode arrays*

Brain Research Protocols, Ausgabe 2 1998, 229 – 242

[43] Marcus Pritschow: *Titannitrid- und Titan-Schichten*

Institut für Mikroelektronik Stuttgart, Doktorarbeit 2007, 17 – 42

[44] SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist processing guidelines for: SU-8 2100 and SU-8 2150

© by Microchem Corporation

[45] L. Berdondini, M. Chiappalone, P.D. Van der Wal, K. Imfeld, N.F. De Rooij, M. Koudelka-Hep, M. Tedesco, S. Martinoia, J. Van Pelt, G. Le Masson, A. Garenne: *A microelectrode array (MEA) integrated with clustering structures for investigating in vitro neurodynamics in confined interconnected sub-populations of neurons*

Sensors and Actuators, Ausgabe 114, 2006, 530 – 541

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Laufe meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Festkörperelektronik (FKE) der technischen Universität Wien.

Ich möchte allen herzlich danken, die zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Herrn O. Univ. Prof. Dr. Emmerich Bertagnolli danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Ass. Prof. Dr. Heinz Wanzenböck danke ich für den wissenschaftlichen Rat und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn A. O. Univ. Prof. Dr. Sigismund Huck und Frau Karin Schwarz vom Hirnforschungsinstitut der Universität Wien danke ich für die kooperative Bereitstellung der Hirnzellen und der zellbiologischen Verfahren zur Zellkultivierung, womit die Grundlage für diese Arbeit geschaffen wurde.

Herrn Ing. Markus Schinnerl möchte ich für die fachmännische Hilfe bei der Herstellung der Lithographiemasken danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen für ihre Hilfsbereitschaft und das produktive Arbeitsklima. In diesem Zusammenhang möchte ich Dipl.-Phys. Dr. Christoph Henkel, DI Dr. Simon Waid, DI Dr. Gottfried Hochleitner, Mag. rer. nat. Maria Hufnagl und Mag. rer. nat. Christian Peter für die hilfreichen Ratschläge bezüglich des Aufbaus des Messsystems hervorheben.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern Iris und Hugo für die Unterstützung und Aufmunterung während der Entstehung dieser Arbeit danken.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Lukas Schneider

Geburtsdatum: 25. Februar 1984

Geburtsort: Bregenz

Familienstand: ledig

Schulausbildung

1990 – 1992 Volksschule Graf-Starhemberg-Gasse, Wien

1992 – 1994 Volksschule Löwengasse, Wien

1994 – 1996 Realgymnasium Stubenbastei, Wien

1996 – 2002 Bundesgymnasium Gallusstraße, Bregenz

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2002 – 2011 Studium Physik an der Universität Wien

2005 – 2008 Studium Bildhauerei, Plastik und Multimedia an der Universität für angewandte Kunst Wien

Beruflicher Werdegang

2006 – 2008 Lehrkraft im Unterstützungskomitee zur Integration von MigrantInnen Wien

11/2009 – 06/2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Festkörperelektronik an der TU Wien